อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

คู่มือบทปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร

(Food Microbiology Laboratory Manual)

โดย

นางสาวเพชรรุ้ง เสนานุช

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน ๒๓ ก.ค. ๒๕๕๗
เลขทะเบียน 1659797
เลขเรียกหนังสือ 2 GB
115
พ๙๗๓
2557

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร 2557

คู่มือบทปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร

(Food Microbiology Laboratory Manual)

โดย

นางสาวเพชรรุ้ง เสนานุช

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร 2557

คำนำ

ด้วยข้าพเจ้า นางสาวเพชรรุ้ง เสนานุช ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ สังกัดภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ได้จัดทำคู่มือปฏิบัติงานเรื่อง "บทปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร" ซึ่งได้เรียบเรียงจากหนังสือบทปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร และ Compendium of Methods for the Microbiological, Bacteriological Analytical Manual (BAM) [online] เพื่อใช้เป็นคู่มือปฏิบัติงานในการเตรียมปฏิบัติการของกระบวนวิชาจุลชีววิทยาอาหาร ของภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นมาตรฐานการปฏิบัติงาน (Standard Operating Procedure) เพื่อความสะดวกและความถูกต้องในการใช้ประกอบในการดำเนินงาน ด้านการเรียนการสอนสำหรับผู้เกี่ยวข้อง ผู้ที่สนใจสามารถใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงาน รวมทั้งบุคคลที่จะเข้ามาดำเนินการทางด้านปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหารสามารถใช้คู่มือเล่มนี้ประกอบได้ หรือสามารถปฏิบัติงานแทนกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยรายละเอียดเน้นวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลาย วิธีปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ แยกตามบทปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาทางอาหาร

หากข้อความหรือข้อมูลของคู่มือปฏิบัติการเล่มนี้มีความผิดพลาดประการใด หรือหากมีข้อเสนอแนะที่จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงคู่มือปฏิบัติการเล่มนี้ ข้าพเจ้ายินดีและพร้อมที่จะนำไปปรับปรุงแก้ไขเพื่อความถูกต้องและความสมบูรณ์ของคู่มือเล่มนี้ต่อไป และข้าพเจ้าขอขอบพระคุณภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร รองศาตราจารย์ ดร.ธีรพร กงบังเกิด ที่ได้กรุณาช่วยให้ข้อมูล คำแนะนำ และตรวจเอกสารในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง แสงอ่อน ที่ได้ให้คำชี้แนะในการจัดทำคู่มือเล่มนี้

(เพชรรุ้ง เสนานุช)
ผู้จัดทำ

สารบัญ

		หน้า
คำนำ	.....	I
สารบัญ	.....	ii
สารัญตาราง	.....	iii
สารบัญภาพ	.....	iv
บทปฏิบัติการที่ 1	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และเทคนิคที่จำเป็นในการตรวจสอบจุลินทรีย์ในอาหาร.....	1
บทปฏิบัติการที่ 2	การตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดในอาหาร.....	14
บทปฏิบัติการที่ 3	การตรวจวิเคราะห์ยีสต์และรา ในอาหาร.....	22
บทปฏิบัติการที่ 4	การตรวจติดตาม(monitoring) จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม.....	29
บทปฏิบัติการที่ 5	การตรวจวิเคราะห์ Coliforms bacteria และ *Escherichia coli* ในอาหาร.....	38
บทปฏิบัติการที่ 6	การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในอาหาร.....	54
บทปฏิบัติการที่ 7	การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในอาหาร.....	84
บทปฏิบัติการที่ 8	การตรวจวิเคราะห์ *Clostridium perfringens* ในอาหาร.....	96
บทปฏิบัติการที่ 9	การตรวจวิเคราะห์ Vibrio ในอาหารทะเล.....	108
บทปฏิบัติการที่ 10	การตรวจวิเคราะห์ *Bacillus cereus* ในอาหาร.....	125
บทปฏิบัติการที่ 11	การตรวจวิเคราะห์ *Yersinia enterocolitica* ในอาหาร.....	141
บทปฏิบัติการที่ 12	การตรวจวิเคราะห์ Lactic acid bacteria ในอาหารหมัก.....	158
บทปฏิบัติการที่ 13	จุลชีววิทยาอาหารกระป๋อง.....	165
บรรณานุกรม	.....	180
ภาคผนวก	.....	182
ประวัติผู้เขียน	.....	183

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	จุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจสอบและสารละลายสำหรับเจือจาง.....	4
1.2	สภาวะที่ใช้สำหรับการบ่มเพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่สำคัญในอาหาร.....	9
1.3	ตัวอย่างการคำนวณโคโลนีต่อกรัมหรือมิลลิลิตร.....	13
6.1	การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อจำแนก *Salmonella*.....	71
6.2	ปฏิกิริยาทางชีวเคมีและน้ำเหลืองวิทยาของ *Salmonella*	73
6.3	เกณฑ์สำหรับการตัดสินว่าเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบนั้นไม่ใช่เชื้อ *Salmonella*.....	74
6.4	AOAC-RI Performance Tested Methods for Detection of *Salmonella* in food and Related Products.....	83
7.1	ปฏิกิริยาทางชีวเคมีเพื่อแยกเชื้อ *S. aureus*.....	93
8.1	ปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ *C. perfringens* และ *Clostridium* สปีชีย์อื่น.....	106
9.1	ลักษณะโคโลนีของ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* บนอาหารแข็ง TCBS agar.....	117
9.2	การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นสำหรับ *V. cholera*.....	118
9.3	ปฏิกิริยาชีวเคมีของ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus*.....	124
10.1	ลักษณะของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *Bacillus cereus*สปีชีย์อื่น....	128
10.2	ลักษณะโคโลนีของ *B. cereus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือกบางชนิด..	135
10.3	ปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ *B. cereus* เทียบกับ Baciilus อื่น.....	140
11.1	ปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ *Y. enterocolitica*.....	153
13.1	การชักตัวอย่างและเกณฑ์การตัดสินใจ.....	179

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1.1 เครื่องตีผสมอาหาร (stomacher)..... 6
1.2 ขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับครั้งละ 10 เท่า..... 7
1.3 โถเพาะเชื้อไร้ออกซิเจน (anaerobic jar)..... 8
2.1 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด โดยวิธี Pour Plate Technique..... 20
2.2 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด โดยวิธี Spread Plate Technique 21
3.1 ขั้นตอนวิธีการตรวจนับจำนวนยีสต์และรา..... 28
4.1 ลักษณะของ RODAC plate ที่เท SPC agar 35
4.2 แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 3M- Petrifilm..... 36
5.1 ขั้นตอนการตรวจสอบ Coliforms bacteria ในอาหารโดยวิธีเอ็มพีเอ็น..... 51
5.2 ขั้นตอนการตรวจ Coliforms bacteria ในอาหาร โดยการนับโคโลนี..... 52
5.3 ขั้นตอนการตรวจ *E. Coli* ในอาหาร โดยการนับโคโลนี..... 53
6.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* โดยวิธี Standard Conventional Method..... 75
6.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* โดยวิธี Modified Method..... 76
7.1 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* โดยวิธี Direct Plate Count Method..... 91
7.2 ลักษณะโคโลนี *S. aureus* บนจานอาหาร Baird-Parker egg-yolk tellurite agar..... 92
7.3 ลักษณะโคโลนี *S. aureus* บนจานอาหาร Mannitol Salt Phenol Red Agar..... 92
7.4 ปริมาณการจับตัวของพลาสมาในการทดสอบโคแอกูเลส..... 93
7.5 ขั้นตอนการตรวจ *S . aureus* โดยวิธีเอ็มพีเอ็น..... 95

ภาพที่ หน้า

8.1 เซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens*..... 97

8.2 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *C. perfringens* โดยการตรวจนับโคโลนี..... 104

8.3 ขั้นตอนการตรวจ *C. perfringens* เพื่อรายงานว่าพบหรือไม่พบ..... 107

9.1 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus*..... 122

9.2 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *V. cholera*..... 123

10.1 ลักษณะโคโลนีของ *B. cereus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือก MYP agar..... 135

10.2 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *B. cereus* โดยวิธีเอ็มพีเอ็น..... 136

10.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ *B. cereus* โดยวิธี Direct plate count..... 137

11.1 ลักษณะโคโลนี *Y. enterocolitica* บนอาหาร MacConkey agar..... 152

11.2 ลักษณะโคโลนี *Y. enterocolitica* บนอาหาร YSA (CIN)..... 152

11.3 ลักษณะโคโลนี *Y. enterocolitica* บนอาหาร LAIA slant..... 156

11.4 ลักษณะโคโลนี *Y. enterocolitica* บนอาหาร Christensen's Urea agar..... 156

11.5 ลักษณะโคโลนี *Y. enterocolitica* บนอาหาร Bile Esculin agar..... 156

11.6 ลักษณะการเคลื่อนที่ของ *Y. enterocolitica* ในอาหาร Motility Test Medium with TTC..... 157

11.7 ลักษณะการเจริญของ *Y. enterocolitica* ในอาหาร MRVR broth 157

11.8 ลักษณะการเคลื่อนที่ของ *Y. enterocolitica* บนอาหาร CRBHO..... 157

12.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติก..... 163

12.2 ขั้นตอนการตรวจนับจำนวน *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus*..... 164

13.1 ขั้นตอนวิธีวิเคราะห์ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) ในอาหารกระป๋องชนิดกรดต่ำ..... 173

13.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ Flat Sour ชนิด Thermophilic และ Mesophilic ในอาหารกระป๋องชนิดกรดต่ำ..... 174

13.3 การวิเคราะห์ Flat Sour ชนิด Mesophilic (Putrefactive) anaerobes ในอาหารกระป๋องชนิดกรดต่ำ..... 175

ภาพที่ หน้า

13.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ Sulfide spoilage ในอาหารกระป๋องชนิดกรดต่ำ..... 176

13.5 ขั้นตอนวิเคราะห์ Flat Sour ชนิด Thermophilic และ Mesophilic ในอาหาร กระป๋องมีความเป็นกรด..... 178

บทปฏิบัติการที่ 1
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และเทคนิคที่จำเป็นในการตรวจสอบจุลินทรีย์ในอาหาร

1.1 ความมุ่งหมาย (Purpose)

เป็นคู่มือการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และเทคนิคที่จำเป็นในการตรวจสอบจุลินทรีย์ในอาหาร

1. 2 การใช้งาน (Application)

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และเทคนิคที่จำเป็นในการตรวจสอบจุลินทรีย์ในอาหาร

1.3 เอกสารอ้างอิง (References)

1.3.1 จารุวรรณ ศิริพรรณพร. (ผู้บรรยาย). (16-17 กุมภาพันธ์ 2541). เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร" สำหรับบุคลากรบริษัทวันไทยอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด . หน้า 1-11. กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

1.3.2 บุญส่ง แสงอ่อน. (2547). คู่มือจุลชีววิทยาทางอาหารภาคปฏิบัติการ. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยนเรศวร. 75 หน้า

1.3.3 วลัยรัตน์ จันทรปานนท์ และเพ็ญขวัญ ชมปรีดา. (2545). คู่มือปฏิบัติการการวัดค่าปัจจัยคุณภาพทางชีวภาพ. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 44 หน้า.

1.3.4 ศิริโฉม ทุ่งเก้า. (2543). ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา. 178 หน้า.

1.3.5 AOAC. (1995). Official Methods of Analyses of Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Associations of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.

1.3.6 Downes, F. P. and ITO, K. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington. DC. 676 p.

1.3.7 ICMSF. (1998). Microorganisms in Foods. Blackie Academic and Profession, London.

1.3.8 U .S. Food and Drug Administration. (1995). Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

1.4 นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

-

1.5 หลักการทางวิทยาศาสตร์ (Principle)

ผู้ปฏิบัติงานการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาต้องเข้าใจถึงเนื้อหา และขั้นตอนเฉพาะเรื่องที่วิเคราะห์อยู่อย่างถูกต้อง นอกจากนั้นผู้ปฏิบัติงานจะต้องตระหนักถึงเรื่องการปนเปื้อนอย่างเคร่งครัด โดยมีหลักสำคัญ ดังนี้

- ป้องกันไม่ให้มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากภายนอกลงในหลอด ฟลาสก์ หรือจานเพาะเชื้อ ฯลฯ ที่กำลังทดลอง

- ป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษาออกไปปนเปื้อน หรือแพร่กระจายไปสู่สภาวะแวดล้อมไม่ว่าจุลินทรีย์นั้นจะเป็นเชื้อก่อโรคหรือไม่ก็ตาม

การป้องกันการปนเปื้อนจากภายนอก มีข้อควรปฏิบัติขั้นพื้นฐานดังต่อไปนี้

1. ดูแลไม่ให้ห้องปฏิบัติการเป็นแหล่งสะสมเชื้อ โดยต้องรักษาความสะอาดไม่ให้เกิดแหล่งสะสมฝุ่นละออง ไม่นำสิ่งที่ไม่จำเป็นเข้ามาในห้องปฏิบัติการ และมีการกำจัดขยะอย่างสม่ำเสมอ
2. ผู้ปฏิบัติต้องเรียนรู้และฝึกเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique)
3. ในกรณีที่ห้องปฏิบัติการไม่มีเครื่องปรับอากาศ ในขณะถ่ายเชื้อ ปลูกเชื้อ หรือเทอาหารใส่จานเพาะเชื้อต้องปิดพัดลม และควรปิดหน้าต่างในจุดที่กระแสลมจะทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ ป้องกันการปนเปื้อนระหว่างการบ่มเชื้อ สำหรับในเขตร้อน เช่น ประเทศไทยปัญหาที่มักเกิดขึ้นได้แก่ การปนเปื้อนอันเกิดจากมด และแมลงอื่น ๆ เช่น แมลงหวี่

ถึงแม้ว่าจะมีจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะแวดล้อมทั่ว ๆ ไป เช่น ในอากาศ ดิน น้ำ เป็นต้น แต่จำนวนที่ปนเปื้อนอยู่จะไม่มีมากเท่ากับเมื่อมีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำกันในห้องปฏิบัติการ โดยแต่ละโคโลนีจะมีเชื้อไม่น้อยกว่า 281 ล้านล้านเซลล์ (2^{48} เซลล์) ดังนั้นหากปฏิบัติไม่ถูก ต้องแล้วห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาจะกลายเป็นบ่อเกิด และแหล่งสำคัญของการแพร่เชื้อออกสู่สภาวะแวดล้อม โดยทั่วไปวัตถุประสงค์ของการตรวจหาจุลินทรีย์ในอาหารก็คือ เพื่อทราบว่าอาหารชนิดหนึ่ง ๆ มีจุลินทรีย์กลุ่มใดอยู่บ้างในปริมาณมากน้อยเพียงใด ทั้งนี้เพื่อต้องการควบคุมคุณภาพและทำนายระยะเวลาการเก็บอาหาร ตลอดจนเพื่อตรวจสอบสุขลักษณะการผลิตและการปฏิบัติต่ออาหาร นอกจากนี้ยังอาจต้องการตรวจสอบว่าอาหารตัวอย่างนั้นมีจุลินทรีย์ก่อโรคปนเปื้อนอยู่ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) หรือไม่ การตรวจหาจุลินทรีย์ในอาหารมีขั้นตอนสำคัญที่ควรปฏิบัติ เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและเชื่อถือได้ดังนี้

1. **การสุ่มเก็บตัวอย่าง (Sampling)**

อาหารหรือวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารชนิดหนึ่ง ๆ ที่ต้องการตรวจหาจุลินทรีย์มักมีการผลิตหรือมีอยู่ปริมาณมาก แต่ในทางปฏิบัติไม่สามารถนำอาหารที่มีทั้งหมดมาตรวจสอบได้ ดังนั้นจึง

ต้องทำการสุ่มตัวอย่าง (sampling) อาหารมาปริมาณหนึ่งเท่านั้น การสุ่มเก็บตัวอย่างมีแนวปฏิบัติโดยทั่วไปดังนี้

1.1 เก็บตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของอาหารชนิดนั้น ๆ และนำมาในปริมาณเพียงพอซึ่งขึ้นกับลักษณะของอาหารและชนิดจุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจหา

- อาหารที่มีลักษณะเหลวและเป็นเนื้อเดียวกัน เช่น นม น้ำเชื่อม หรือไอศกรีมที่บรรจุในภาชนะขนาดใหญ่ ให้กวนหรือคนให้เข้ากัน และนำมาปริมาณ 200-500 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะปลอดเชื้อที่มีฝาปิดสนิท ป้องกันการหกของตัวอย่าง
- อาหารที่มีลักษณะแข็งหรือแห้ง ถ้ามีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน เช่น แป้ง หรือนมผง ให้นำมาน้ำหนักประมาณ 200-300 กรัม ถ้ามีลักษณะไม่เป็นเนื้อเดียวกัน เช่น ปลา ผัก หรือเนื้อสัตว์ ให้สุ่มตัวอย่างจากหลาย ๆ จุด ให้ได้น้ำหนักรวมกันไม่น้อยกว่า 200 กรัม
- ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบจุลินทรีย์แอนแอโรบส์ (anaerobes) หรือพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ควรสุ่มเก็บตัวอย่างจากบริเวณที่มีออกซิเจนน้อยหรือไม่มี เช่น บริเวณด้านในที่อยู่ลึกลงไปของอาหาร และเก็บตัวอย่างไว้ในภาชนะที่ป้องกันออกซิเจน

1.2 เก็บตัวอย่างโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ได้แก่ การป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากภายนอกลงในตัวอย่างในทุกขั้นตอน โดยใช้วัสดุอุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่าง เช่น ช้อนตักตัวอย่าง แท่งสำหรับกวนผสมตัวอย่าง ปากคีบ กรรไกร รวมทั้งภาชนะสำหรับบรรจุตัวอย่างที่ปลอดเชื้อ ตลอดจนปิดฝาภาชนะบรรจุตัวอย่างให้สนิทเป็นต้น

1.3 บันทึกรายละเอียดของตัวอย่าง เช่น ชื่ออาหาร ลักษณะของตัวอย่าง วันที่เก็บตัวอย่าง เป็นต้น

2. การขนส่งและการเก็บรักษาตัวอย่าง (Transportation and Samples preservation)

เมื่อเก็บตัวอย่างได้แล้วควรขนส่งตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจสอบจุลินทรีย์โดยเร็วที่สุด นอกจากนั้นยังควรรักษาสภาพของตัวอย่างระหว่างการขนส่ง เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ที่มีในตัวอย่าง ถ้าตัวอย่างเป็นอาหารแช่เย็นหรือแช่เยือกแข็งให้รักษาสภาพด้วยน้ำแข็งแห้ง และถ้าไม่สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ทันทีควรเก็บรักษาไว้ในสภาพที่เหมาะสมตัวอย่างเช่น อาหารที่เน่าเสียได้ง่าย เช่น ผักสด และเนื้อสัตว์ ให้เก็บรักษาโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิไม่เกิน 4.4 องศาเซลเซียส แต่ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 48 ชั่วโมง ถ้าเป็นอาหารที่ไม่เน่าเสียง่าย เช่น อาหารกระป๋อง หรืออาหารแห้งให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับอาหารแช่เยือกแข็งให้เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ถ้าเป็นตัวอย่างสำหรับตรวจสอบจุลินทรีย์กลุ่มแอนแอโรบส์ให้เก็บรักษาในสภาพที่ปลอดออกซิเจน เป็นต้น

3. การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation)

ก่อนที่จะนำอาหารตัวอย่างมาตรวจสอบจุลินทรีย์ต้องมีการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งขั้นตอนในการเตรียมนั้น ขึ้นกับลักษณะของตัวอย่างดังนี้

3.1 การละลายน้ำแข็ง ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นอาหารแช่เยือกแข็งให้นำมาละลายน้ำแข็งก่อน โดยอาจวางตัวอย่างไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิไม่เกิน 4.4 องศาเซลเซียส) เพื่อให้น้ำแข็งละลายภายในระยะเวลาไม่เกิน 18 ชั่วโมง หรือละลายน้ำแข็งในอ่างน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส ภายในเวลาไม่เกิน 15 นาที

3.2 การทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน ในกรณีอาหารตัวอย่างมีลักษณะเหลวและเป็นเนื้อเดียวกัน ให้ผสมตัวอย่างโดยเขย่าภาชนะบรรจุขึ้นลงเร็วๆ ถ้าเป็นอาหารแห้งหรืออาหารแข็งชิ้นใหญ่ๆ ให้ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกรปลอดเชื้อ หรือปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (homogenizer หรือ blender)

3.3 การชั่งตัวอย่าง ตัวอย่างอาหารที่นำมาตรวจหาจุลินทรีย์จะต้องใช้ปริมาณที่แน่นอน เพื่อให้แปรผลได้ถูกต้อง โดยชั่งตัวอย่างน้ำหนักให้แน่นอนใส่ในภาชนะปลอดเชื้อ เช่น ถุงพลาสติก หรือขวดแก้วที่มีความจุเพียงพอ เช่น ไม่น้อยกว่า 500 มิลลิลิตร เนื่องจากต้องมีการเติมสารละลายลงไปเจือจางตัวอย่างด้วย

4. การเจือจางตัวอย่าง (Dilution)

การเจือจางตัวอย่าง (dilution) หมายถึง การนำตัวอย่างปริมาณหนึ่งมาผสมกับสารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) ปริมาตรหนึ่ง และทำให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อลดความหนาแน่นของจุลินทรีย์ในตัวอย่างให้อยู่ในระดับที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่เชื่อถือได้ นอกจากนั้นในกรณีตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นของแข็ง การเจือจางยังช่วยทำให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในตัวอย่างหลุดออกมาอยู่ในสารละลายอีกด้วย สารละลายสำหรับเจือจางมักมีส่วนผสมที่ช่วยให้เซลล์จุลินทรีย์มีชีวิตอยู่ได้ระยะเวลาหนึ่งโดยไม่เพิ่มจำนวน ตัวอย่างสารละลายสำหรับเจือจางที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์กับจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ดังสรุปไว้ใน ตารางที่ 1.1

ตาราง 1.1 จุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจสอบและสารละลายสำหรับเจือจาง

จุลินทรีย์	สารละลายสำหรับเจือจาง
แอโรบส์ (aerobes) หรือพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 7.2 เปปโตนเข้มข้น 0.1 % (0.1 % peptone water) เปปโตนเข้มข้น 0.1 % ที่มีเกลือเข้มข้น 0.85 % สารละลายริงเกอร์เจือจาง 4 เท่า (quarter strength Ringer's solution)

แอนแอโรบส์ (anaerobes) หรือพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ	Reinforced clostridial medium
ฮาโลไฟล์ (halophiles) หรือพวกที่ชอบเจริญในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง	สารละลายเกลือเข้มข้น 15 % (15 % NaCl solution)
ออสโมไฟล์ (osmophiles) หรือพวกที่ชอบเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง	สารละลายซูโครสเข้มข้น 20 % (20 % sucrose solution)

น้ำยาเจือจาง (diluents) ที่เหมาะสมมีหลายชนิดที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ 0.1 % peptone water และ phosphate buffer น้ำยาเจือจางตัวอย่างนิยมบรรจุไว้ในภาชนะ 450 มิลลิลิตร, 225 มิลลิลิตร, 99 มิลลิลิตร, 90 มิลลิลิตร หรือ 9 มิลลิลิตร ถ้าตัวอย่างอาหารเป็นของแข็งนิยมใช้ตัวอย่างน้ำหนัก 25 หรือ 50 กรัม ส่วนตัวอย่างอาหารที่เป็นของเหลวนิยมใช้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร การคำนวณระดับความเจือจาง ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ และปริมาณน้ำยาเจือจางที่ใช้สามารถใช้สูตรด้านล่างนี้คำนวณได้ ดังตัวอย่างที่ 1 และ 2

$$\frac{\text{ตัวอย่างเป็นของแข็ง (กรัม) หรือ ของเหลว (มิลลิลิตร)}}{\text{ตัวอย่างอาหารเริ่มต้นไม่ได้เจือจาง (กรัม) หรือ มิลลิลิตร + น้ำยาเจือจาง}} \quad * \text{ ตัวอย่างอาหารเริ่มต้นไม่ได้เจือจาง}$$

ตัวอย่างที่ 1 ถ้าใช้ตัวอย่างเนื้อหมูบด 25 กรัม ใส่ลงในน้ำยาเจือจางปริมาตร 225 มิลลิลิตร จงหาระดับความเจือจางของเนื้อหมูบด

แทนค่าในสูตร

กำหนดให้ระดับความเจือจางใหม่มี = X

จะได้ $\frac{25 \text{ g.}}{25 \text{ g.} + 225 \text{ ml.}} * 1 = X$

หมายเหตุ * คือเครื่องหมาย X (คูณ)

1 คือตัวอย่างอาหารเริ่มต้นที่ไม่ได้เจือจาง หรือมีค่าระดับความเจือจาง = 10^0

ดังนั้น $= \frac{25}{250} * 1$

$= \frac{1}{10} = 10^{-1}$

ตัวอย่างที่ 2 ถ้าต้องการเจือจางตัวอย่างอาหารชนิดหนึ่งที่มีความเจือจาง 10^{-1} ให้เป็น 10^{-2} โดยใช้น้ำยาเจือจาง 90 มิลลิลิตร อยากทราบว่าต้องใช้ตัวอย่างดังกล่าวปริมาตรกี่มิลลิลิตร

แทนค่าในสูตร

กำหนดให้ X คือปริมาตรของตัวอย่างที่ต้องการใช้ในการเจือจาง

$$\frac{X * 10^{-1}}{X + 90} = \frac{1}{10^{2}}$$

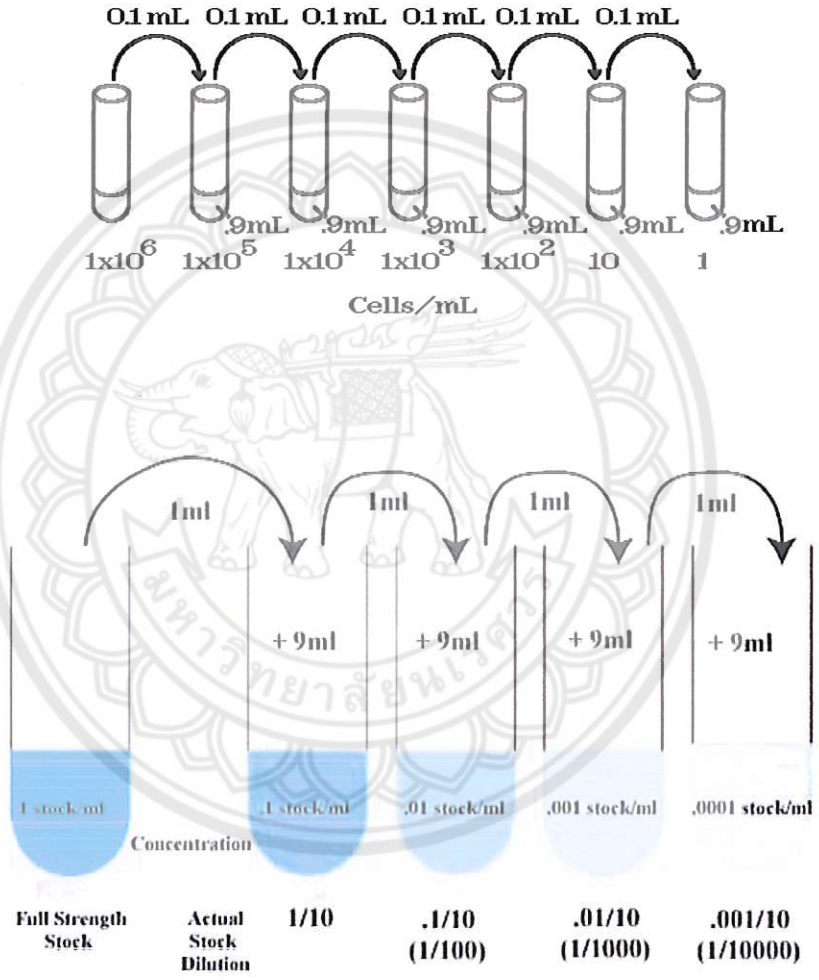
ดังนั้น X = 10 มิลลิลิตร

โดยทั่วไปมักทำให้ตัวอย่างเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (10-fold dilution) ซึ่งทำได้โดยผสมตัวอย่างกับสารละลายสำหรับเจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 เป็นลำดับ โดยเริ่มแรกจะชั่งตัวอย่างน้ำหนักแน่นอน เช่น 10, 25 หรือ 50 กรัม ผสมกับสารละลายสำหรับเจือจางปริมาตร 90, 225 หรือ 450 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นจึงทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ตัวอย่างที่เจือจางลงจากเดิม 10 เท่า (1/10 หรือ 10^{-1})

การทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันนั้น อาจใช้วิธีปั่นตัวอย่างให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า (homogenizer) หรือใช้วิธีตีบดด้วยเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher) (ภาพที่ 1.1) เครื่องมือชนิดนี้มีหลักการทำงานโดยอาศัยการตีสลับกันของแผ่นโลหะ 2 แผ่นลงบนถุงพลาสติกที่บรรจุตัวอย่างและสารละลายสำหรับเจือจาง เมื่อตีผสมตัวอย่างเป็นระยะเวลาหนึ่ง เช่น 30 วินาที หรือ 60 วินาที จะทำให้ตัวอย่างละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันอย่างไรก็ตามเครื่องมือชนิดนี้มีข้อจำกัดคือไม่เหมาะกับตัวอย่างอาหารที่มีลักษณะแข็ง

ภาพ 1.1 เครื่องตีผสมอาหาร (stomacher)

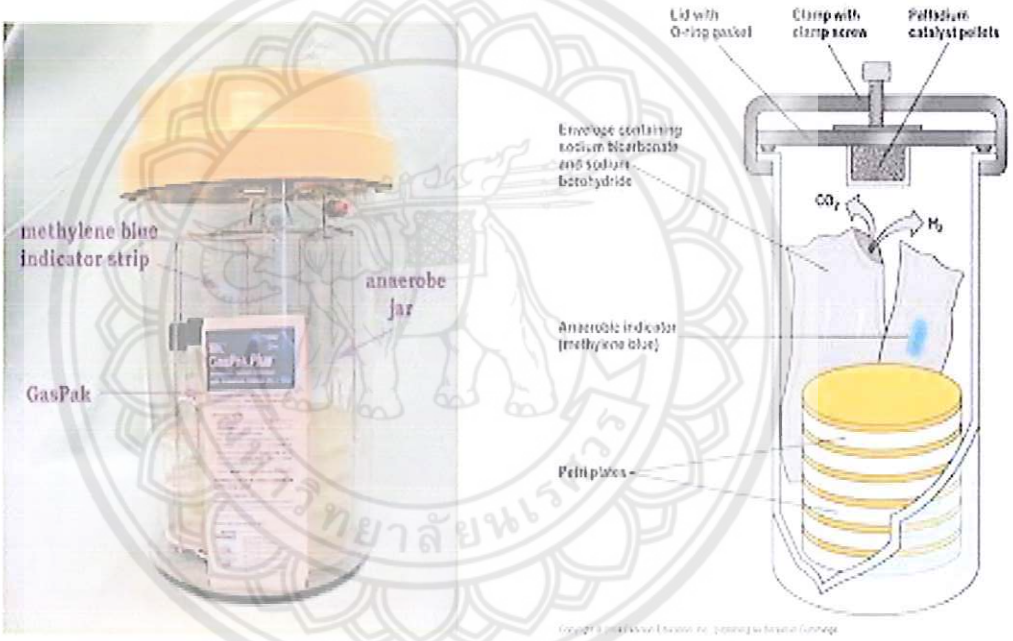
สำหรับการเจือจางตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1} ลงต่อไปอีกครั้งละ 10 เท่านั้น มีวิธีการคือ ถ่ายตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายสำหรับเจือจางปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-2} (หรือ 1/100) จากนั้นจึงทำการเจือจางโดยวิธีเดียวกันต่อไปอีกจนตัวอย่างมีความเจือจางถึงระดับที่ต้องการ สำหรับขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับครั้งละ 10 เท่าดังกล่าวสรุปไว้ในภาพที่ 1.2



ภาพ 1.2 ขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับครั้งละ 10 เท่า

5. สภาวะการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Cultivative condition)

เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางสารอาหารแตกต่างกันในการเจริญ ดังนั้นจึงควรจัดสภาวะการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจหาจุลินทรีย์ที่พบในอาหารบางชนิดนั้นอาจเป็นพวกที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่าอุณหภูมิปกติ นอกจากนั้นความต้องการออกซิเจนในการเจริญของจุลินทรีย์ยังแตกต่างกันอีกด้วย โดยพวกแอนแอโรบส์ควรบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มที่มีการดึงออกซิเจนออก หรือในโถเพาะเชื้อไร้ออกซิเจน (anaerobic jar) (ภาพ 1.3) ซึ่งมีลักษณะเป็นโถโลหะหรือพลาสติกภายในใส่ซองบรรจุสารเคมีที่ให้ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ซึ่งก๊าซนี้จะรวมกับก๊าซออกซิเจน (O_2) ในโถ ได้น้ำ (H_2O) โดยมีพัลเลเดียม (palladium) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมีแผ่นชุบสารละลายเมทิลีนบลู (methylene blue) เป็นดัชนีสำหรับตรวจสอบว่ามีออกซิเจนเหลืออยู่ในโถหรือไม่



ภาพ 1.3 โถเพาะเชื้อไร้ออกซิเจน (anaerobic jar)

สำหรับสภาวะการบ่มเพาะจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ โดยทั่วไปสรุปไว้ในตาราง 1.2

ตาราง 1.2 สภาวะที่ใช้สำหรับการบ่มเพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ที่สำคัญในอาหาร

กลุ่มของจุลินทรีย์	สภาวะการบ่มเพาะเชื้อ
ไซโครโทรบส์ (psychrotrophs) หรือพวกที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ	อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส 10 วัน
มีโซไฟล์ (mesophiles) หรือพวกที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง	อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง
เทอร์โมไฟล์ (thermophiles) หรือพวกที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 48-72 ชั่วโมง
ยีสต์และรา	อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส 3-5 วัน
แอนแอโรบส์	อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในตู้บ่มไร้ออกซิเจน หรือในโถเพาะเชื้อไร้ออกซิเจน

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ในอาหารนั้นควรเลือกให้เหมาะสมด้วย โดยทั่วไปอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์อาจแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (solid medium) หรืออาหารวุ้น (agar medium) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (liquid medium หรือ broth) นอกจากนั้นยังอาจมีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็ง (semi-solid medium) ด้วย

การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทใดขึ้นกับวัตถุประสงค์และลักษณะของตัวอย่างอาหารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างเช่น ถ้าต้องการเพาะแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารให้เจริญเป็นโคโลนี มักใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เช่น plate count agar หรือ nutrient agar และถ้าต้องการแยกโคโลนีของยีสต์และราในอาหารมักใช้เพาะเลี้ยงด้วย potato dextrose agar หรือ malt extract agar ถ้าอาหารตัวอย่างมีจุลินทรีย์ที่ต้องการตรวจหาอยู่ปริมาณน้อย อาจเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ซึ่งเรียกว่า enrichment ก่อน เป็นต้น

6. การนับจำนวนจุลินทรีย์ (Enumeration of Microorganisms)

จำนวนจุลินทรีย์ เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องเรียนรู้นอกเหนือจากเรื่องอื่นๆ ที่เกี่ยวกับจุลินทรีย์ในอาหาร ทั้งนี้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิต การควบคุมปริมาณจุลินทรีย์หรือการควบคุมคุณภาพอาหาร เป็นต้น การนับจำนวนจุลินทรีย์สามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันมานาน และยังใช้อย่างได้ผลดีในปัจจุบัน

การนับจำนวนจุลินทรีย์จะได้ผลดีเพียงใด ต้องขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างเช่น การเก็บและการรักษาตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ประเภทและชนิดของจุลินทรีย์ที่ต้องการนับ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเชื้อ จำนวนซ้ำของการทดสอบ หรือความละเอียดรอบคอบของผู้ปฏิบัติงาน

6.1 Colony Count Method

มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น Standard Plate Count, Aerobic Plate Count, Total plate Count, Viable Plate Count หรือ Mesophilic Count เป็นวิธีตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดที่แท้จริงในผลิตภัณฑ์อาหาร เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถเจริญและสร้างโคโลนีให้เห็นได้ อาจเป็นผลมาจากกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์นั้นๆ ทำให้เซลล์บางส่วนถูกทำลายหรือเป็นเซลล์ที่อ่อนแอเกินไป หรืออาจเนื่องจากสภาวะไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต เทคนิคที่นิยมใช้ในวิธีนี้ได้แก่

6.1.1 Pour plate เป็นเทคนิคที่ทำให้เชื้อหรือตัวอย่างเจือจางลง (dilution) ด้วยสารละลายเพื่อเจือจางที่เหมาะสม ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและทราบปริมาตรที่แน่นอน ทำการเจือจางเพื่อให้เชื้อมีการเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ความเจือจางที่เหมาะสมควรมีการเจริญของเชื้อระหว่าง 25 - 250 โคโลนี โดยปกติจะทำให้เจือจางเพิ่มขึ้นครั้งละ 10 เท่าเป็นลำดับ (ten fold dilution) เพื่อให้ง่ายต่อการปฏิบัติและการคำนวณจำนวนโคโลนีต่อหน่วยนับ (กรัม หรือ มิลลิลิตร)

6.2.2 Spread Plate เป็นการแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ที่สามารถตรวจนับปริมาณได้โดยมีการเจือจางเป็นลำดับส่วน (Serial dilution) จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่มีความเจือจางตามต้องการโดยวิธี aseptic technique ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างลงบนอาหารวุ้นแข็ง และทำ การเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร ด้วย Sterile spreader แท่งแก้วงอรูปตัว L ที่ทำจากแท่งแก้ว โคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญบนอาหารวุ้นแข็งเท่านั้น วิธีการ spread plate นี้ ง่ายและสะดวกกว่าวิธี pour plate แต่ไม่เหมาะกับจุลินทรีย์พวกที่ไวต่อออกซิเจน ข้อได้เปรียบเทคนิคนี้คือ จุลินทรีย์ไม่ได้รับความร้อนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้การเจริญเป็นไปได้ด้วยดี จึงสามารถนับโคโลนีที่แท้จริงได้ถูกต้อง นอกจากนี้ยังใช้เทคนิคนี้กับอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทุกชนิด แม้แต่อาหารทึบแสง แต่เนื่องจากใช้ปริมาณตัวอย่างเพียง 0.1 – 0.5 มิลลิลิตร จึงไม่เหมาะที่จะใช้กับตัวอย่างที่ปริมาณจุลินทรีย์ต่ำ

ข้อควรระวัง

6.2.2.1 สามารถใช้ปริมาณตัวอย่างมากกว่า 0.1 มิลลิลิตร ได้ แต่ต้องคำนึงถึงผิวหน้าของอาหารควรแห้งสนิทหลังจากที่เกลี่ยด้วยแท่งแก้วงอแล้วไม่มีตัวอย่างเหลืออยู่บนผิวหน้าหรือติดค้างอยู่บนแท่งแก้ว ทั้งนี้เพื่อความถูกต้องในการนับจำนวนโคโลนีที่แท้จริงทั้งหมด หรือเพื่อความสะดวกในการคำนวณอาจใช้ 0.2 มิลลิลิตร ของตัวอย่างจากระดับความเจือจาง 1:10 หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 plate นับจำนวนโคโลนีรวมกันทั้งหมด เท่ากับ 1 กรัม รายงานผลเป็น CFU/g

6.2.2.2 ควรแยกใช้แท่งแก้วงอกับอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละจาน ไม่ควรใช้เกลี่ยซ้ำกันหลายๆ จาน หรือถ้าจำเป็นต้องใช้ซ้ำกัน ควรเริ่มจากตัวอย่างที่ทำให้เจือจางมากที่สุด ไปสู่ระดับเจือจางน้อยที่สุด (1:1000 ⟶1:10)

6.1.3 Membrane Filtration วิธีนี้เหมาะสำหรับการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีปริมาณมาก แต่มีจุลินทรีย์ปะปนอยู่จำนวนน้อย ก่อนที่จะนับจำนวนโคโลนีควรทำให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นขึ้น แล้วนำไปกรองผ่านเยื่อกรองที่กักเซลล์แบคทีเรีย (Bacteriological Membrane Filter) แต่ยอมให้น้ำหรือตัวทำละลายผ่านได้ คำนวณจุลินทรีย์ในตัวอย่างจากจำนวนโคโลนีที่นับได้ รายงานผลเป็นโคโลนีต่อกรัม หรือ มิลลิลิตร

6.1.4 Drop plate เป็นเทคนิคการนับจุลินทรีย์ที่คล้ายคลึงกับเทคนิค Spread plate ต่างกันตรงที่ไม่ต้องใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยตัวอย่างบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างอาหารที่ทำให้เจือจางแล้วจะถูกวัดปริมาตรจำนวนหยดโดยใช้ปิเปตที่ผ่านการคำนวณ นำตัวอย่างดังกล่าวหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใช้อุณหภูมิและเวลาในการบ่มที่เหมาะสม นำมานับจำนวนโคโลนีของเชื้อจากความเจือจางที่เหมาะสม คำนวณจำนวนโคโลนี 1 มิลลิลิตร โดยทราบจำนวนโคโลนีเฉลี่ยใน 1 หยด จำนวนหยดใน 1 มิลลิลิตร และ dilution factor ที่ตรวจนับได้ รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ไม่เหมาะสมที่จะใช้กับตัวอย่างอาหารที่มีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่า 3,000 โคโลนีต่อกรัม

6.1.5 Swab เป็นเทคนิคที่ใช้กันมานานและแพร่หลายในการตรวจสอบจุลินทรีย์ตามผิวหน้าของอาหาร เครื่องมือ และวัสดุต่างๆ วิธีการคือ จุ่ม swab ลงไปในหลอดทดลองที่มีตัวทำละลายที่ทราบปริมาตรที่แน่นอนบรรจุอยู่ หักก้านที่ใช้จับออกไป เขย่าหลอดแรงๆ หลายครั้ง นำสารละลายไปตรวจสอบปริมาณด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือตรวจนับโดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้ทำให้สะดวก รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย แต่อาจจะนับจุลินทรีย์จากผิวหน้าที่ต้องการไม่ได้ทั้งหมด อีกทั้งตัวละลายอาจชะล้างจุลินทรีย์ออกจาก swab ได้ไม่หมดเช่นกัน

6.2 Direct Microscopic Count

เป็นการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดจากกล้องจุลทรรศน์โดยตรง ซึ่งจะรวมทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ทำได้โดย smear ตัวอย่างที่ทราบปริมาตรบนพื้นที่ที่กำหนดไว้ของแผ่นสไลด์ ทำให้แห้ง ย้อมสีด้วยสีเฉพาะ นับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ คำนวณค่าเป็น Direct Microscopic Count ต่อกรัม หรือ มิลลิลิตร

หรืออาจใช้สไลด์เฉพาะ เรียกกว่า Haemacytometer มีหลุมที่ทราบความลึกและปริมาตรที่แน่นอน พร้อมทั้งเครื่องหมายพื้นที่เป็นตารางสี่เหลี่ยม นับจำนวนจุลินทรีย์ในพื้นที่ดังกล่าว แล้วคำนวณปริมาณจุลินทรีย์ได้โดยใช้ค่าเฉลี่ยจำนวนที่นับได้ทั้งหมด

วิธีนี้ทำได้สะดวก รวดเร็ว ใช้เวลาในการตรวจนับสั้น บอกรูปร่างลักษณะของเซลล์ได้ แต่มีข้อจำกัดคือ ความเที่ยงตรงมีน้อย

6.3 Most Probable Number (MPN) Technique

ค่า MPN เป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้หลักการทางสถิติโดยประเมินจากค่าดัชนีตัวเลขของเชื้อที่มีความเป็นไปได้มากกว่าตัวเลขอื่น การตรวจสอบใช้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 3

2.4 นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

2.4.1 PCA = Plate Count Agar

2.4.2 CFU = Colony Forming Unit

2.5 หลักการทางวิทยาศาสตร์ (Principle)

จุลินทรีย์ในอาหาร (Microorganism in Foods)

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็ก ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 3 กลุ่มคือ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา แต่ละกลุ่มมีมากมายหลายชนิด ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ กันได้แก่ ในดิน น้ำ อากาศ คน สัตว์ และอาหารเป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้ในปริมาณหนึ่งจะไม่ก่อให้เกิดอันตรายใดๆ แต่ถ้ามีมากจนเกินขีดจำกัดและปนเปื้อนในอาหาร อาจก่อให้เกิดโทษหรือเกิดโรคในคนและสัตว์ได้

จุลินทรีย์ที่พบในอาหาร แบ่งออกได้ตามความสำคัญต่ออาหารและผู้บริโภคดังนี้

1. จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ และเป็นที่ต้องการในการผลิตอาหาร ได้แก่ การผลิตนม เปรี้ยว น้ำส้มสายชู ขนมปัง หรือซีอิ๊ว เป็นต้น ตัวอย่างแบคทีเรียเช่น *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Acetobacter aceti*, ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อรา *Aspergillus oryzae* เป็นต้น

2. จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ถ้าคนได้รับเชื้อกลุ่มนี้ในปริมาณมากอาจทำให้เกิดความผิดปกติในระบบย่อยอาหารได้ เช่น *Bacillus* sp. และ *Rhizopus* sp. เป็นต้น

3. จุลินทรีย์ที่เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลและนิยมใช้เป็นดัชนีคุณภาพอาหารทางด้านสุขาภิบาล แบคทีเรียที่สำคัญ ได้แก่ Coliform Group ซึ่งประกอบด้วย Coliform bacteria, Faecal coliforms, *E. coli* และ *Streptococcus faecalis*

4. จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เนื่องจากตัวเชื้อจุลินทรีย์เองหรือจากสารพิษที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาตัวอย่างจุลินทรีย์ได้แก่ *Staphyloccus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp. และ *Clostridium perfringens*

Aerobic plate count เป็นวิธีการที่ถูกนำมาใช้เพื่อชี้ให้เห็นถึงจำนวนของเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่าง ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้อาจเรียกว่า aerobic colony count, standard plate count, mesophilic count หรือ total plate count โดยอยู่บนพื้นฐานที่ว่าเซลล์ที่ฟอร์มตัวกันจนเห็นเป็นลักษณะของโคโลนีด้วยตาเปล่านั้น จะเกิดขึ้นได้เมื่อถูกผสมด้วยอาหารวุ้นที่มีสารอาหารที่เหมาะสม วิธีการนี้ไม่สามารถนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดได้ หากแต่บอกเป็นนัยว่าเป็นการทดสอบโดยทั่วไปสำหรับสิ่งมีชีวิตที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ ณ อุณหภูมิ 25 - 40 องศาเซลเซียส (mesophilic temperatures) และไม่สามารถบอกถึงความแตกต่างของชนิดของแบคทีเรียได้ (Downes and ITO, 2001) การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญเป็นโคโลนีและนับจำนวน (colony

บทปฏิบัติการที่ 2
การตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด

2.1 ความมุ่งหมาย(Purpose)

เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดในอาหาร

2.2 การใช้งาน (Application)

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดในอาหาร

2.3 เอกสารอ้างอิง (References)

1.3.1 จารุวรรณ ศิริพรรณพร. (ผู้บรรยาย). (16-17 กุมภาพันธ์ 2541). เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร" สำหรับบุคลากรบริษัทวันไทยอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด . หน้า 1-11. กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

1.3.2 บุญส่ง แสงอ่อน. (2547). คู่มือจุลชีววิทยาทางอาหารภาคปฏิบัติการ. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยนเรศวร. 75 หน้า

1.3.3 วลัยรัตน์ จันทรปานนท์ และเพ็ญขวัญ ชมปรีดา. (2545). คู่มือปฏิบัติการการวัดค่าปัจจัยคุณภาพทางชีวภาพ. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 44 หน้า.

1.3.4 ศิริโฉม ทุ่งเก้า. (2543). ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา. 178 หน้า.

2.3.5 AOAC. (1995). Official Methods of Analyses of Association of Official Analytical Chemists.16th ed. Associations of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.

2.3.6 Downes, F. P. and ITO, K. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington. DC. 676 p.

2.3.7 ICMSF. (1998). Microorganisms in Foods. Blackie Academic and Profession, London.

2.3.8 U .S. Food and Drug Administration. (1995). Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = n/d/10

หรือ = n x df x 10

จำนวนโคโลนีต่อกรัม (CFU/g หรือ CFU/ml) คือจำนวนโคโลนีที่นับได้คูณด้วย dilution factor ในการคัดเลือก plate เพื่อนำมาคำนวณ โดยมีจำนวนโคโลนีที่นับได้อยู่ในช่วง 25 - 250 โคโลนี แต่ละ dilution ทำ 2 plate หลักเกณฑ์ที่ใช้มีหลายกรณี ได้แก่ (ดูตารางที่ 1.3 ประกอบ)

7.1 ถ้ามีเพียง 1 dilution เท่านั้นที่อยู่ใน ช่วง 25 -250 โคโลนีต่อจาน ให้นับจำนวนทั้งหมด แล้วหารด้วย 2 ดูตัวอย่างที่ 1

7.2 ถ้านับได้ 2 dilution โดยที่จำนวนแตกต่างไม่เกิน 2 เท่า ให้ใช้ค่าเฉลี่ย plate ที่นับได้ แต่ถ้าจำนวนแตกต่างกันเกิน 2 เท่า ให้ใช้ค่าที่ได้คูณด้วย dilution factor แล้วให้เลือกใช้ค่าที่น้อยกว่า ดูตัวอย่างที่ 2 และ 3

7.3 ถ้าทุก plate มีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 25 หรือไม่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี ให้รายงานเป็น Est (Estimated CFU/g หรือ ml) โดยนับใน plate ที่มีจำนวนใกล้เคียง 250 โคโลนี ดูตัวอย่างที่ 4 หรือถ้าทุก plate มีน้อยกว่า 25 โคโลนีให้นับ dilution ที่มีการเจือจางต่ำสุด ดูตัวอย่างที่ 5

7.4 ถ้าเกิด spreader (Spr) หรือ Lab Accident (LA) ดูตัวอย่าง 6, 7 และ 8

ตารางที่ 1.3 ตัวอย่างการคำนวณโคโลนีต่อกรัมหรือมิลลิลิตร (CFU/g or CFU/ml)

ตัวอย่าง	จำนวนโคโลนีที่นับได้ Dilution 1:100	1 : 1000	จำนวนโคโลนีต่อกรัมหรือ มล. (CFU/g, CFU/ml.)
1	*175*	16	19,000
	208	17	
2	*228*	*28*	25,000
	240	*26*	
3	*138* แตกต่าง	42 แตกต่าง	15,000
	162 1.2 เท่า	33 2.4 เท่า	
4	*287*	23	280,000 Est
	263	19	
5	*18*	2	17,000 Est
	16	0	
6	Spr	31	31,000
7	243	LA	24,000
8	27	215	LA

หมายเหตุ ตัวเลขที่เป็นตัวเอียงและขีดเส้นใต้ แสดงถึง plate ที่เลือกนับในแต่ละ dilution

ความเข้มข้นเรียงกัน ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ความเข้มข้นละ 3 หลอด หรือ 5 หลอด บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิและเวลาที่กำหนด นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกซึ่งดูได้จากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เช่น การสร้างก๊าซ หรืออาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น จากจำนวนหลอดที่นับได้เปรียบเทียบกับค่าในตาราง MPN อ่านผลจำนวนเซลล์โดยประมาณเป็น MPN ต่อกรัม หรือ มิลลิลิตร วิธี MPN แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนได้แก่

6.2.1 Presumptive test เป็นการทดสอบขั้นแรก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นๆ

6.2.2 Confirm test เป็นการบ่มเพาะเชื้อจากหลอดทดลองที่ให้ผลบวกของการทดสอบขั้นแรกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะมากขึ้น เพื่อยืนยันผลการตรวจ Presumptive test

6.2.3 Complete test เป็นการทดสอบขั้นสมบูรณ์ โดยการนำเซลล์จากหลอดทดลองที่ให้ผลบวกใน Confirm test มาทำการแยกเชื้อ เพื่อให้เชื้อนั้นอยู่ในสภาพบริสุทธิ์พร้อมที่จะตรวจสอบสัณฐานวิทยาคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่นๆ

โดยปกติในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ จุลินทรีย์จะมีการกระจายตัวไม่เท่าเทียมกัน แต่ในน้ำเซลล์จะมีการกระจายได้ดีกว่า วิธีการ MPN จึงเหมาะสมและนิยมใช้กับตัวอย่างที่เป็นน้ำหรือเป็นอาหารเหลวทำให้ค่า MPN ที่ได้จะมีความถูกต้องแน่นอนกว่า

7. การคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ (Amount of microbial calculation)

จำนวนจุลินทรีย์มีชีวิตในอาหาร 1 กรัม (กรณีอาหารตัวอย่างเป็นของแข็ง) หรือ 1 มิลลิลิตร (กรณีอาหารตัวอย่างเป็นของเหลว) คำนวณได้เมื่อทราบค่าจำนวนโคโลนีเฉลี่ยใน 1 จาน ที่หาได้จากทุกซ้ำของความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนีต่อจานระหว่าง 30-300 (หรือ 25-250) และสมมุติว่า 1 โคโลนีเจริญมาจาก 1 เซลล์ อย่างไรก็ตามในความเป็นจริงบางโคโลนีอาจเจริญมาจากเซลล์มากกว่า 1 ที่เกาะกลุ่มกันหรือเรียงต่อกันเป็นสาย ดังนั้นจึงควรใช้คำว่า colony forming unit (CFU) แทนคำว่า colony และค่า CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร ของตัวอย่างจากวิธีพอร์เพลท คำนวณได้จากความสัมพันธ์ดังต่อไปนี้

CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = n/d

เมื่อ n คือ จำนวนโคโลนีเฉลี่ยใน 1 จาน ของจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 (หรือ 25-250) ต่อจาน

และ d คือ ความเจือจางของตัวอย่างที่นำมาเพาะในจานที่หาค่า n ได้

หรือ **CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = n x df**

เมื่อ df คือ dilution factor หรือส่วนกลับของความเจือจางดังกล่าว

หมายเหตุ ในกรณีที่ใช้วิธีสเปรดเพลท ซึ่งใช้ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรมาเพาะเชื้อค่า CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร หาได้จากความสัมพันธ์ดังนี้

count) เป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณเซลล์จุลินทรีย์มีชีวิต (viable cells) ที่มีในอาหารวิธีหนึ่ง การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญเป็นโคโลนีดังกล่าวทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมใช้กันมากได้แก่ วิธีพอร์เพลท (pour plate) และวิธีสเปรดเพลท (spread plate หรือ surface plate) นอกจากนั้นยังอาจใช้วิธีอื่นๆ เช่น วิธีดรอปเพลท (drop plate) และวิธีสไปรัลเพลท (spiral plate) เป็นต้น (ศิริโฉม, 2543) วิธีการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (aerobic plate count) โดยใช้อาหารวุ้น เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดในการวัดจำนวนจุลินทรีย์ที่มีอยู่ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหาร วิธีนี้มีหลักการ คือ จุลินทรีย์ 1 เซลล์ในอาหารเมื่อผสมกับอาหารวุ้นแล้วจะเจริญเติบโตเป็น 1 โคโลนีเดี่ยว ๆ ที่แยกจากกัน (วลัยรัตน์ และเพ็ญขวัญ, 2545)

การตรวจนับจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดในอาหารมีความสำคัญอย่างยิ่ง ถ้าการวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำสามารถใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจคุณภาพของผลิตภัณฑ์ว่าผ่านเกณฑ์ตามที่กฎหมายกำหนด (ในต่างประเทศและต่างประเทศ) หรือผ่านเกณฑ์ตามความต้องการของผู้ซื้อผลิตภัณฑ์อาหารหรือไม่ บางครั้งข้อมูลนี้ใช้เป็นแนวทางในการประเมินราคาวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สุดท้าย นอกจากนี้อาจใช้ทำนายอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ได้ถ้าชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบมีบทบาทสำคัญต่อการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์ (จำนวนจุลินทรีย์ที่มีมากขึ้นมีความสัมพันธ์เชิงลบกับคุณภาพของผลิตภัณฑ์)

2.6 เอกสารที่เกี่ยวข้อง (Associated document)

กฎการตรวจนับโคโลนีแบคทีเรียบนจานเพาะเชื้อและการรายงานผล

2.7 ความปลอดภัย (Safety)

2.7.1 ต้องสวมเสื้อคลุมตลอดระยะเวลาปฏิบัติการเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ติดผิวหนังหรือเสื้อผ้า รวมทั้งป้องกันตัวเองและเสื้อผ้าจากการกระเด็นของสารเคมีและสิ่งสกปรกต่างๆ

2.7.2 ห้ามรับประทานอาหาร ดื่มหรือสูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนห้ามเคี้ยว หรือกัดดินสอ ปากกา

2.7.3 หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับหน้าหรือตาระหว่างปฏิบัติงาน

2.7.4 ก่อนและหลังปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อความสะอาดบริเวณปฏิบัติงานทุกครั้ง

2.7.5 ต้องติดฉลาก แสดง ชื่อ วันที่ ตัวอย่าง ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อหรืออื่นๆ ลงบน จานเพาะเชื้อหรืออุปกรณ์ ทดลองเพื่อป้องกันการล้างหรือนำไปทิ้งโดยไม่ตั้งใจ

2.7.6 ใช้ตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์ด้วยความระมัดระวัง ห้ามวางตะเกียงดังกล่าวไว้ใกล้ภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์หรือสารไวไฟต่างๆ รวมทั้งระมัดระวังมือและเส้นผม หรือส่วนต่างๆ ของร่างกายจากการถูกไฟลวก ดับตะเกียงทุกครั้งเมื่อเลิกใช้งาน

2.7.7 วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม จานเพาะเชื้อหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปล้าง

2.7.8 สไลด์ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปกำจัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

2.7.9 ก่อนและหลังปฏิบัติการทุกครั้งต้องล้างมือด้วยสบู่ และเช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์) ทุกครั้ง

2.8 เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment's and supplies)

2.8.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณภูมิ 32- 35 องศาเซลเซียส

2.8.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

2.8.3 เครื่องวัด pH (pH meter)

2.8.4 เครื่องชั่ง (Balance)

2.8.5 เครื่องแก้ว ได้แก่ Petri dishes, Pipette, Dilution bottle, Glass rod spreader, Slide

2.8.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

2.8.7 กรรไกรปลอดเชื้อ

2.8.8 เครื่องตีผสมอาหารอาหาร (Stomacher)

2.8.9 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

2.8.10 น้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับเช็ดโต๊ะปฏิบัติการ

2.9 สารมาตรฐาน (Standards)

2.9.1 PCA (Plate count agar)

2.9.2 0.1 % Peptone water

2.10 วิธีดำเนินการ (Procedures)

2.10.1 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.10.1.1 สารละลายเพื่อเจือจาง (Dilution Blank)

สารละลายเพื่อเจือจาง มีอยู่หลายชนิด การเลือกใช้ขึ้นกับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ชนิดของอาหารที่จะตรวจสอบ และวิธีที่ใช้ สารละลายที่นิยมใช้ ได้แก่

- สารละลายเจือจางธรรมดา (Plain Dilution Blanks) หรือน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- สารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% (Peptone Dilution Blanks 0.1% หรือ Peptone Solution)
- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer Dilution Blanks หรือ Phosphate Buffer Solution PBS)

- สารละลายเกลือเพื่อเจือจาง (Saline Dilution Blanks หรือ 0.85% NaCl solution)

- Phosphate Buffer Solution (PBS)

วิธีเตรียม

ก. Stock Solution

ละลาย Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 34 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย 1 N NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส หรือที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ข. Dilution Blanks

นำ Stock Solution มา 1.25 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองบรรจุ 9 มิลลิลิตร บรรจุขวดแก้วทนร้อน 90 มิลลิลิตร และ 225 มิลลิลิตร

- 0.1 % Peptone water

วิธีการเตรียม

ชั่งเปปโตน (Merck) หนัก 1 กรัม ผสมน้ำ 1,000 มิลลิลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน บรรจุใส่ในภาชนะตามขนาดที่ต้องการ (หลอดทดลองบรรจุ 9 มิลลิลิตร บรรจุขวดแก้วทนร้อน 90 มิลลิลิตร และ 225 มิลลิลิตร) นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.10.1.2 PCA (Plate count agar) หรือ Standard Method Agar

ส่วนผสม

-	Tryptone	5.0	กรัม
-	Yeast extract	2.5	กรัม
-	D-glucose	1.0	กรัม
-	Agar	15.0	กรัม
-	น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0 $\pm$ 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด บรรจุใส่ภาชนะตามขนาดที่ต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หรือ ชั่ง PCA 22.5 กรัม (Merck) /น้ำกลั่น 1 ลิตร ละลายและบรรจุใส่ภาชนะและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกัน

2.10.2 วิธีดำเนินการ

2.10.2.1 วิธีเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เป็นของแข็ง ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลายเปปโตน 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในถุง นำไปตีผสมเป็นเวลา 60 วินาที จะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1}

ตัวอย่างที่เป็นของเหลว ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดซึ่งมีน้ำยาเจือจาง 90 มิลลิลิตรปิดฝาขวดเจือจางให้สนิท เขย่าขึ้นลงอย่างแรง 25 ครั้ง จะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1}

2.10.2.2 ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดบรรจุสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม จะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-2} จากนั้นทำการเจือจางด้วยวิธีเดียวกันจนถึงระดับที่ต้องการ

2.10.2.3 นำตัวอย่างที่ความเจือจางเหมาะสม 3 ระดับ (เช่น 10^{-2},10^{-3} และ 10^{-4}) มาปฏิบัติดังนี้

วิธีพอร์เพลท (Pour plate)

- ถ่ายตัวอย่างจากแต่ละความเจือจางลงในจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ 2 จานๆ ละ 1 มิลลิลิตร
- เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่หลอมเหลว อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง จานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการหมุนจานและรอจนวุ้นแข็ง

วิธีสเปรดเพลท (Spread plate)

- ถ่ายตัวอย่างแต่ละความเจือจางลงบนผิวของอาหาร PCA ในจานเพาะเชื้อ 2 จานๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร
- ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อ (เผาด้วยเปลวไฟ ทิ้งไว้ให้เย็น) เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าของอาหารแต่ละจาน

2.10.2.4 บ่มจานเพาะเชื้อ (โดยวางจานแบบคว่ำ) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.10.2.5 นับจำนวนโคโลนีจากแต่ละจานเพาะเชื้อ หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีใน 1 จาน และคำนวณ CFU (Colony Forming Unit) ต่อกรัมของตัวอย่างที่ได้จากวิธีพอร์เพลทและวิธีสเปรดเพลท

การตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด โดยวิธี Pour Plate Technique วิธีวิเคราะห์แสดงดังภาพ 2.1

Colony Count Method : Pour Plate Technique

ดูดหรือชั่งตัวอย่าง

(ดูด 10 มล. หรือ 25 กรัม)

↓

เจือจางด้วย PBS หรือ 0.1% Peptone water

ให้มีความเข้มข้น 1:10, 1:100,1:1000....

↓

ดูด 1 มล. ของแต่ละ dilution ลงจานเพาะเชื้อ

(แต่ละ dilution ทำ 2 ซ้ำ)

↓

เท Plate Count Agar (PCA) ที่หลอมอุณหภูมิ ~ 45 องศาเซลเซียส

จานเพาะเชื้อ ละ 10-15 มล. หมุนจานผสมให้เข้ากัน

↓

วางทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง กลับจานเพาะเชื้อ

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

↓

นับจำนวนโคโลนี

ภาพ 2.1 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด โดยวิธี Pour Plate Technique

การอ่านผล นับจำนวนโคโลนีในจานที่มี 25 - 250 โคโลนี

การคำนวณ ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี คูณกับ dilution factor

การรายงานผล จำนวนโคโลนีต่อกรัม หรือ มิลลิลิตร (CFU/g หรือ CFU/ml)

CFU = Colony Forming Unit

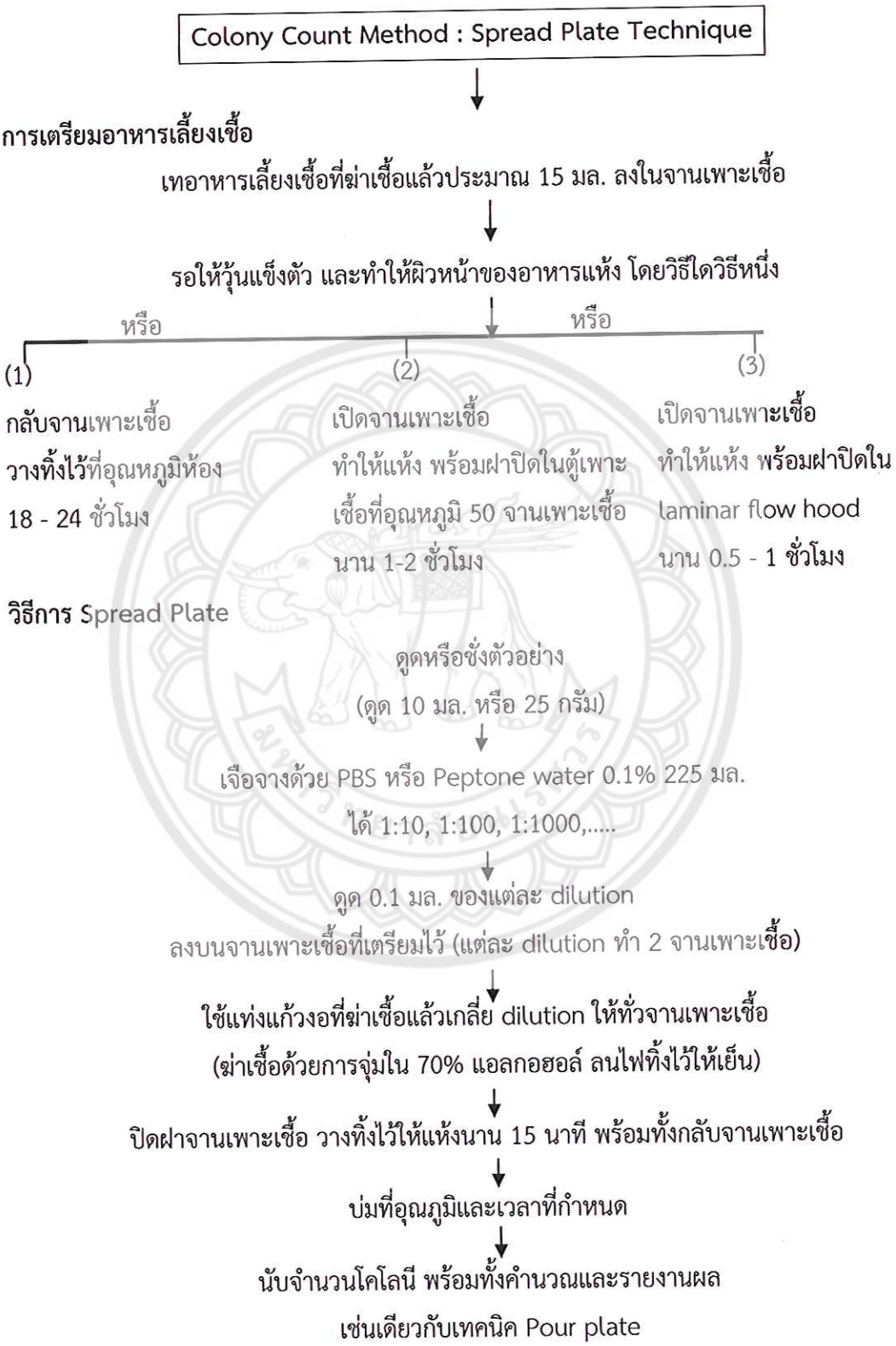
<u>ตัวอย่าง</u> จำนวนโคโลนีที่เฉลี่ย = 55.8 โคโลนี นับได้จาก dilution $1 : 10^5$

ตัวอย่าง $1/10^5$ นับแบคทีเรียได้ = 55.8 โคโลนี

ตัวอย่าง 1 กรัม นับได้ = $\frac{55.8 \times 10^5}{1}$

= 5.58×10^6 โคโลนี

การตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด ด้วยวิธี Spread Plate Technique วิธีการตรวจวิเคราะห์แสดงดังภาพ 2.2



ภาพ 2.2 การตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด โดยวิธี Spread Plate Technique

บทปฏิบัติการที่ 3
การวิเคราะห์จำนวนยีสต์และรา ในอาหาร

3.1 ความมุ่งหมาย (Purpose)

เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจำนวนยีสต์และราทั้งหมดในอาหาร

3.2 การใช้งาน (Application)

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจำนวนยีสต์และราทั้งหมดในอาหาร

3.3 เอกสารอ้างอิง (References)

3.3.1 จารุวรรณ ศิริพรรณพร. (ผู้บรรยาย). (16-17 กุมภาพันธ์ 2541). เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร" สำหรับบุคลากรบริษัทวันไทยอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด . หน้า 1-11. กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

3.3.2 บุญส่ง แสงอ่อน. (2547). คู่มือจุลชีววิทยาทางอาหารภาคปฏิบัติการ. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยนเรศวร. 75 หน้า

3.3.3 AOAC. (1995). Official Methods of Analyses of Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Associations of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.

3.3.4 Downes, F. P. and ITO, K. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington. DC. 676 p.

3.3.5 ICMSF. (1998). Microorganisms in Foods. Blackie Academic and Profession, London.

3.3.6 U .S. Food and Drug Administration. (1995). Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

3.4. นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

3.4.1	PDA	=	Potato Dextrose Agar
3.4.2	CFU	=	Colony Forming Unit
3.4.3	df	=	dilution factor
3.4.4	RDBA	=	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar
3.4.5	MEA	=	Malt Extract Agar

3.5 หลักการทางวิทยาศาสตร์ (principle)

เนื่องจากยีสต์และรามีอยู่ทั่วไปในทุกสภาวะแวดล้อม ดังนั้นจึงพบยีสต์และราเกิดขึ้นและเป็นปัญหาในอาหารทุกชนิด โดยสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิตั้งแต่ 5 - 35 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีในสภาพที่มีความเป็นกรด ในการตรวจสอบจึงเติมกรดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย อาหารที่นิยมใช้กันทั่วไปคือ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่ปรับ pH เป็น 3.5 ด้วย 10% tartaric acid วิธีวิเคราะห์ทำได้โดยใช้วิธีการเดียวกับการนับจุลินทรีย์ทั้งหมด เทคนิคที่นิยมใช้คือ Pour Plate แต่ในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อนสูง จะใช้วิธีการตรวจสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว คือ Malt Extract Broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ถ้ามีการเจริญของเชื้อยีสต์และราอาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่น หรือมีการเจริญที่ผิวหน้าของอาหาร ทดสอบยืนยันโดยใช้ PDA หรือ Sabouraud's Dextrose Agar แล้วย้อมสีดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ รายงานผลเป็นลักษณะพบหรือไม่พบ (จารุวรรณ, 2541)

3.6 เอกสารที่เกี่ยวข้อง (Associated document)

กฎการตรวจนับโคโลนีแบคทีเรียบนจานเพาะเชื้อและการรายงานผล

3.7 ความปลอดภัย (Safety)

3.7.1 ต้องสวมเสื้อคลุมตลอดระยะเวลาปฏิบัติการเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ติดผิวหนังหรือเสื้อผ้า รวมทั้งป้องกันตัวเองและเสื้อผ้าจากการกระเด็นของสารเคมีและสิ่งสกปรกต่างๆ

3.7.2 ห้ามรับประทานอาหาร ดื่มหรือสูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนห้ามเคี้ยว หรือกัดดินสอ หรือ ปากกา

3.7.3 หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับหน้าหรือตาระหว่างปฏิบัติงาน

3.7.4 ก่อนและหลังปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อความสะอาดบริเวณปฏิบัติงานทุกครั้ง

3.7.5 ต้องติดฉลาก แสดง ชื่อ วันที่ ตัวอย่าง ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อหรืออื่นๆ ลงบน จานเพาะเชื้อหรืออุปกรณ์ ทดลองเพื่อป้องกันการล้างหรือนำไปทิ้งโดยไม่ตั้งใจ

3.7.6 ใช้ตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์ด้วยความระมัดระวัง ห้ามวางตะเกียงดังกล่าวไว้ใกล้ภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์หรือสารไวไฟต่างๆ รวมทั้งระมัดระวังมือและเส้นผม หรือส่วนต่างๆ ของร่างกายจากการถูกไฟลวก และดับตะเกียงทุกครั้งเมื่อเลิกใช้งาน

3.7.7 วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม จานเพาะเชื้อหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปล้าง

3.7.8 สไลด์ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปกำจัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

3.7.9 ก่อนและหลังปฏิบัติการทุกครั้งต้องล้างมือด้วยสบู่ และเช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์) ทุกครั้ง

3.8 เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipments and supplies)

3.8.1 ตู้อบบ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.8.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

3.8.3 กระดาษวัด pH (pH paper)

3.8.4 เครื่องชั่ง (Balance)

3.8.5 เครื่องแก้ว ได้แก่ Petri dishes, pipette, dilution bottle, glass rod spreader

3.8.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ตั้งอุณหภูมิ 50^{0}ซ

3.8.7 กรรไกรตัดตัวอย่าง

3.8.8 เครื่องผสมอาหาร (Stomacher)

3.8.9 เครื่องนับโคโลนี (Colony counter)

3.8.10 รางแช่ไปเปต

3.8.11 น้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับเช็ดโต๊ะปฏิบัติการ

3.9. สารมาตรฐาน (Standards)

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี</u>

3.9.1 Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar

3.9.2 Malt Extract Agar

3.9.3 Peptone water 0.1%

3.9.4 PDA (Potato Dextrose Agar)

3.10. วิธีดำเนินการ (Procedures)

3.10.1 วิธีการเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.10.1.1 Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar

<u>ส่วนผสม</u>

- Glucose	10.0 กรัม
- Peptone	5.0 กรัม
- Potassium phosphate, monobasic	1.0 กรัม
- Magnesium sulfate heptahydrate	0.5 กรัม
- Rose bangal (5% soln., w/v)	0.5 มิลลิลิตร
- Chloramphenicol	0.1 กรัม
- Dichloran solution (2,6-dichloro-4-nitroaniline) (0.2% (w/v) in ethanol)	1.0 มิลลิลิตร
- Agar	15.0 กรัม

สำนักหอสมุด
๒๓ ก.ค. ๒๕๕๗
1.65991511

- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 5.6 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังนึ่งฆ่าเชื้อปรับ pH เป็น 5.6 ด้วยกรดทาร์ทาร์ริก 10 % แล้วเติม Dichloran solution 1 มิลลิลิตร (กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน) ก่อนนำมาเทใส่จานเพาะเชื้อ

3.10.1.2 Malt Extract Agar

ส่วนผสม

- Malt extract 20.0 กรัม
- Dextrose 20.0 กรัม
- Peptone 1.0 กรัม
- Agar 15.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 4.7 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังนึ่งฆ่าเชื้อปรับ pH เป็น 4.6 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล ก่อนนำมาเทใส่จานเพาะเชื้อ

3. 10.1.3 Potato Dextrose Agar

ส่วนผสม

- Potato infusion form 200.0 กรัม
- Glucose 20.0 กรัม
- Agar 15.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 3.5 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังนึ่งฆ่าเชื้อปรับ pH เป็น 3.5 ด้วยกรดทาร์ทาริก 10% หรือ กรดแลคติก ก่อนนำมาเทใส่จานเพาะเชื้อ

3.10.1.4 Peptone (0.1%)

ส่วนผสม

- Peptone	1.0 กรัม
- น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

วิธีเตรียม

ละลายเปปโตน 1 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.1 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.10.2 วิธีดำเนินการวิเคราะห์

3.10.2.1 วิธีเตรียมตัวอย่าง

ของแข็ง ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลายเปบโตน 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในถุง นำไปตีผสมด้วยเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher) เป็นเวลา 60 วินาที จะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1}

ของเหลว ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดซึ่งมีน้ำยาเจือจาง 90 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดเจือจางให้สนิท เขย่าขึ้นลงอย่างแรง 25 ครั้ง จะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1}

3.10.2.2 ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดบรรจุสารละลายเปบโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) จะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-2} จากนั้นทำการเจือจางด้วยวิธีเดียวกันจนถึงระดับที่ต้องการ

3.10.2.3 นำตัวอย่างที่ความเจือจางเหมาะสม 3 ระดับ (เช่น 10^{-2},10^{-3} และ 10^{-4}) มาปฏิบัติดังนี้

วิธีสเปรดเพลท (Spread plate)

- ถ่ายตัวอย่างแต่ละความเจือจางลงบนผิวของอาหาร DRBA หรือ PDA ในจานเพาะเชื้อ 2 จานๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร
- ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อ (เผาด้วยเปลวไฟ ทิ้งไว้ให้เย็น) เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าของอาหารแต่ละจาน

3.10.2.4 บ่มจานเพาะเชื้อ (โดยวางจานแบบคว่ำ) ที่อุณหภูมิ 25–30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 วัน

3.10.2.5 นับจำนวนโคโลนีจากแต่ละจานเพาะเชื้อ หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีใน 1 จาน และคำนวณค่า CFU ต่อกรัมของตัวอย่างที่ได้จากวิธีสเปรดเพลท

3.10.2.6 การคำนวณ

วิธีสเปรดเพลท ซึ่งใช้ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเชื้อ ค่า CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร หาได้จากความสัมพันธ์ดังนี้

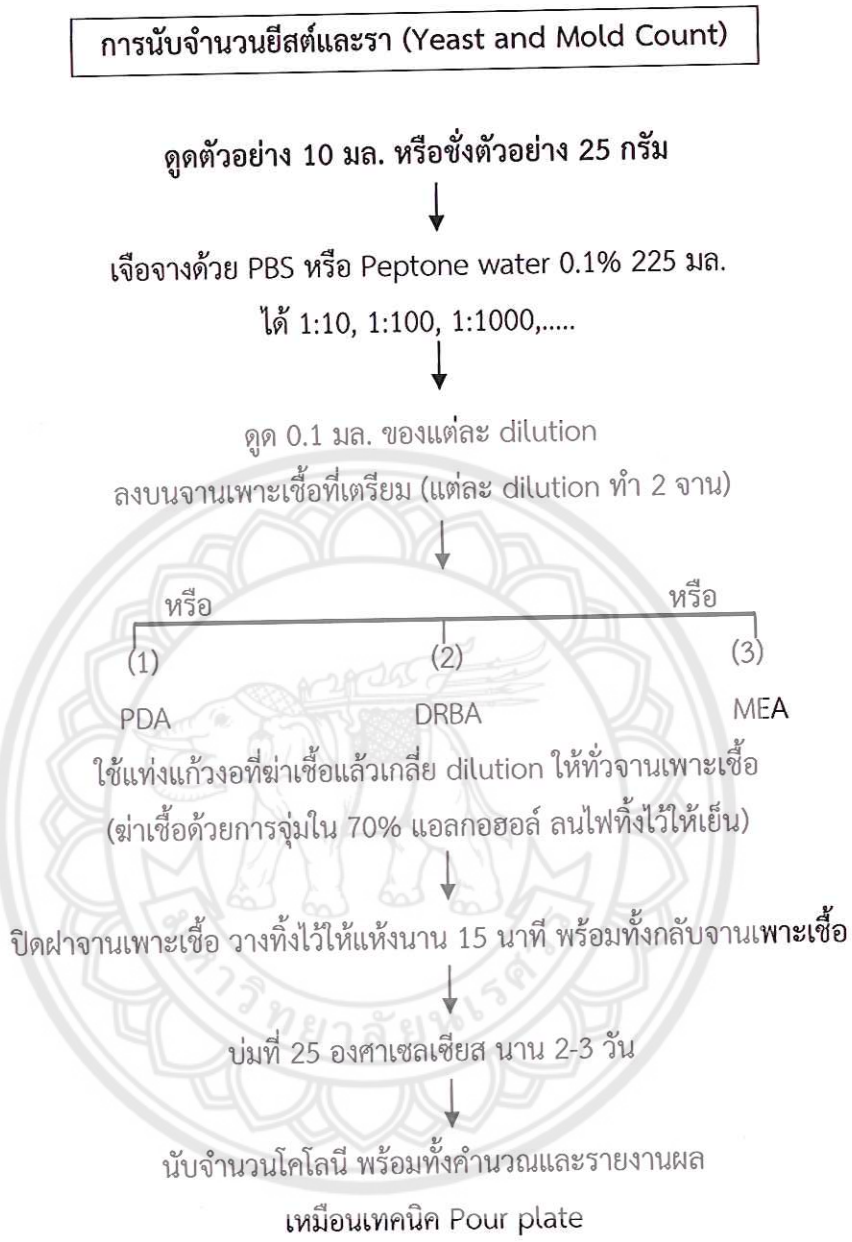
CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร $= n/d/10$

หรือ $= n \times df \times 10$

เมื่อ n คือจำนวนโคโลนีเฉลี่ยใน 1 จาน ของจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25 -250 โคโลนีต่อจาน

df คือ dilution factor หรือส่วนกลับของความเจือจางดังกล่าว

วิธีการตรวจนับจำนวนยีสต์และรา วิธีการตรวจนับแสดงดังภาพ 3.1



ภาพ 3.1 ขั้นตอนวิธีการตรวจนับจำนวนยีสต์และรา

บทปฏิบัติการที่ 4
การตรวจติดตาม จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร

4.1 ความมุ่งหมาย (Purpose)

เป็นคู่มือในการตรวจการตรวจติดตาม จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร

4.2 การใช้งาน (Application)

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติการตรวจติดตาม จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร

4.3 เอกสารอ้างอิง (References)

4.3.1 บุญส่ง แสงอ่อน. (2547). คู่มือจุลชีววิทยาทางอาหารภาคปฏิบัติการ. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยานเรศวร. 75 หน้า

4.3.4 Downes, F. P. and ITO, K. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington. DC. 676 p.

4.4. นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

4.4.1	Sanitizer	=	สารฆ่าเชื้อ
4.4.2	PDA	=	Potato Dextrose agar
4.4.2	SPC	=	Standard plate count

4.5 หลักการทางวิทยาศาสตร์ (principle)

โปรแกรมการสุขาภิบาลที่ดี (Good wholesome sanitation program หรือ GSP) เป็นโปรแกรมที่มีส่วนร่วมในการผลิตอาหารของโรงงานอุตสาหกรรมอาหารให้มีความสะอาดและปลอดภัยต่อผู้บริโภค โปรแกรมต่างๆ เช่น HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) GMP (Good Manufacturing Practice) และ TQM (Total Quality Management) จะใช้การตรวจติดตามทางสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นกุญแจสำคัญของโปรแกรม ข้อมูลที่ได้ต้องจัดทำแผนภูมิ และประเมินโดยบุคคลที่ได้รับมอบหมาย ข้อมูลที่ได้ต้องถูกกำหนดขึ้นเพื่อให้สามารถดำเนินการแก้ไขเมื่อระดับจุลินทรีย์เกินระดับที่ยอมรับได้ บางบริษัทใช้การให้โบนัสตอบแทนพนักงานเพื่อจูงใจให้ ช่วยกันรักษาระดับจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารและอุปกรณ์การผลิตให้อยู่ในระดับต่ำได้สำเร็จ การรักษาระดับจุลินทรีย์ของ อุปกรณ์ ผนัง พื้น ทางระบายน้ำ อากาศ น้ำ และการให้การศึกษาแก่พนักงาน ซึ่งมีความสำคัญด้านสุขาภิบาล (สุขลักษณะ) ต้องเป็นส่วนหนึ่งอยู่ในโปรแกรมนี้ การบริหารจัดการต้องให้ความสำคัญ

ต่อการผลิต ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูงจึงจะสามารถแข่งขันได้ในตลาดยุคปัจจุบัน สำหรับประเทศไทย ขณะนี้มีกฎหมายของกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยระบบ GMP (Good Manufacturing Practice) หรือหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ออกบังคับในโรงงานอาหารของอาหารที่ระบุไว้ในกฎหมาย ต้องมีระบบ GMP ที่ได้รับมาตรฐานและผ่านการประเมินจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องของกระทรวงสาธารณสุข (อย.) (บุญส่ง, 2547)

4.6 เอกสารที่เกี่ยวข้อง (Associated document)

-

4.7 ความปลอดภัย (Safety)

4.7.1 ต้องสวมเสื้อคลุมตลอดระยะเวลาปฏิบัติการเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ติดผิวหนังหรือเสื้อผ้า รวมทั้งป้องกันตัวเองและเสื้อผ้าจากการกระเด็นของสารเคมีและสิ่งสกปรกต่างๆ

4.7.2 ห้ามรับประทานอาหาร ดื่มหรือสูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนห้ามเคี้ยว หรือกัดดินสอ หรือ ปากกา

4.7.3 หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับหน้าหรือตาระหว่างปฏิบัติงาน

4.7.4 ก่อนและหลังปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อความสะอาดบริเวณปฏิบัติงานทุกครั้ง

4.7.5 ต้องติดฉลาก แสดง ชื่อ วันที่ ตัวอย่าง ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อหรืออื่นๆ ลงบน จานเพาะเชื้อ หรืออุปกรณ์ ทดลองเพื่อป้องกันการล้างหรือนำไปทิ้งโดยไม่ตั้งใจ

4.7.6 ใช้ตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์ด้วยความระมัดระวัง ห้ามวางตะเกียงดังกล่าวไว้ใกล้ภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์หรือสารไวไฟต่างๆ รวมทั้งระมัดระวังมือและเส้นผม หรือส่วนต่างๆ ของร่างกายจากการถูกไฟลวก และดับตะเกียงทุกครั้งเมื่อเลิกใช้งาน

4.7.7 วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม จานเพาะเชื้อหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปล้าง

4.7.8 สไลด์ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปกำจัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

4.7.9 ก่อนและหลังปฏิบัติการทุกครั้งต้องล้างมือด้วยสบู่ และเช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์) ทุกครั้ง

4.8 เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and supplies)

4.8.1 ตู้อบบ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 32 องศาเซลเซียส

4.8.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

4.8.3 กระดาษวัด pH (pH paper)

4.8.4 เครื่องชั่ง (Balance)

4.8.5 เครื่องแก้ว ได้แก่ petri dishes, Pipette, Dilution bottle, Glass rod spreader

4.8.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

4.8.7 Sterile nonabsorbent cotton swab

4.8.8 Template ขนาด 50 ตารางเซนติเมตร

4.8.9 ROADC plate

4.8.10 เครื่องนับโคโลนี (Colony counter)

4.8.11 รางแช่ไปเปต

4.9. สารมาตรฐาน (Standards)

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี</u>

4.9.1 3% H_2O_2 บรรจุในหลอดทดสอบ 5 มิลลิลิตร

4.9.2 0.1% Peptone water

4.9.3 PDA (Potato Dextrose Agar)

4.9.4 PCA (Standard Plate Count)

4.9.5 Phosphate buffer with sanitizer neutralizer (PSBN) บรรจุในหลอดทดสอบ 5 มิลลิลิตร

4.10. วิธีดำเนินการ (Procedures)

4.10.1 วิธีการเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.10.1.1 3% H_2O_2

<u>ส่วนผสม</u>

- H_2O_2 (30%) 10.0 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น 90.0 มิลลิลิตร

<u>วิธีเตรียม</u>

ปิเปต H_2O_2 (30%) มา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป ให้ปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร บรรจุใส่หลอดทดสอบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร

4.10.1.2 Peptone (0.1%)

<u>ส่วนผสม</u>

- Peptone 1.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายเปปโตน 1 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.1 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4.10.1.2 PCA (Plate Count Agar) หรือ Standard Method Agar

ส่วนผสม

- Tryptone	5.0	กรัม
- Yeast extract	2.5	กรัม
- D-glucose	1.0	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด บรรจุใส่ภาชนะตามขนาดที่ต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หรือ ชั่ง PCA 22.5 กรัม (Merck) /น้ำกลั่น 1 ลิตร ละลายและบรรจุใส่ภาชนะและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกัน ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อ 15 มิลลิลิตร และเทใส่ ROADC plate 15 มิลลิลิตร

4.10.1.3 Potato Dextrose Agar

ส่วนผสม

- Potato infusion form	200.0	กรัม
- Glucose	20.0	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 3.5 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับ pH เป็น 3.5 ด้วยกรดทาร์ทาริก 10% หรือ กรดแลคติก

4.10.1.4 Phosphate Buffer Solution (PBS)

วิธีเตรียม

ก. Stock Solution : ละลาย Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 34 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย 1 N NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส หรือที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ข. Dilution Blanks : นำ Stock Solution มา 1.25 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองบรรจุ 5 มิลลิลิตร

4.10.2 วิธีดำเนินการวิเคราะห์

4.10.2.1 การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์พื้นผิวด้วยเทคนิค swab พื้นผิวสัมผัส (swabbing contact surfaces)

วิธีปฏิบัติ

- Swab พื้นที่ 50 ตารางเซนติเมตร โดยครั้งแรกทำไม้ swab ให้เปียก ด้วยการจุ่มลงใน PSBN 5 มิลลิลิตร
- กดปลาย swab กับผนังด้านในหลอดเพื่อบีบ PSBN ออกให้ swab หมาด จากนั้นนำไม้ swab ไปเช็ดถูยังพื้นที่เป้าหมายโดย swab เอียงเป็นมุม 30 องศา และถู swab ไป - มาให้ทั่วพื้นผิว 50 ตารางเซนติเมตร (ถูกลับไป – กลับมา) ทำ 3 ครั้ง จากนั้นนำ swab จุ่มน้ำยาเจือจาง แล้วเขย่าหลอด จากนั้นกด swab กับผนังด้านในของหลอดทดสอบให้หมาดเพื่อรีดน้ำยาส่วนเกินออกไป นำ swab ดังกล่าว swab พื้นที่ 50 ตารางเซนติเมตร ที่เหลืออีก 4 พื้นที่ แต่ละพื้นที่ใช้วิธีทำนองเดียวกันที่กล่าวมา ล้าง swab ในน้ำยาเจือจางหลังจากการ swab แต่ละพื้นที่และรีดน้ำยาส่วนเกินออกจากหัว swab ทุกครั้ง (ควร swab ใน template พื้นที่ 50 ตารางเซนติเมตร)
- หลังจาก swab พื้นที่ลำดับที่ 5 (พื้นที่สุดท้าย) เสร็จแล้วให้นำ swab จุ่มในน้ำยาเจือจาง แล้วล้างหัว swab จากนั้นหักด้าม swab ออกให้เหลือเฉพาะส่วนหัว swab แช่อยู่ในน้ำยาเจือจาง ปิดฝาเกลียวหลอดทดสอบให้แน่น จากนั้นบรรจุหลอดดังกล่าวลงในถังน้ำแข็ง นำกลับมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทันที
- การตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ในจานเพาะเชื้อดำเนินการดังนี้ เขย่าน้ำยาเจือจางตัวอย่างดังกล่าวอย่างแรง เจือจางตามลำดับถึง 10^{-1} จากนั้นดูดตัวอย่างใส่จานเพาะเชื้อจากระดับความเจือจาง 10^{0} ถึง 10^{-1} ใส่จานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเทอาหาร PCA (Standard plate count) อุณหภูมิ 42 – 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อ เขย่าจานเพาะเชื้อไปมา ซ้าย-ขวา 2 – 3 รอบ รอให้อาหารแข็งตัว บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยการกลับจานเพาะเชื้อ ตรวจนับจำนวนจำนวนจุลินทรีย์เมื่อครบเวลา
- กรณีเป็นภาชนะหรืออุปกรณ์ที่มีลักษณะเป็นชิ้น เช่น แก้ว, จาน, ช้อน, ส้อม ฯลฯ ให้สุ่มเลือกตัวอย่างเหล่านั้นมา 4 ชิ้น จากบริเวณที่ภาชนะหรืออุปกรณ์ดังกล่าวถูกเก็บไว้ ควร swab อุปกรณ์ให้ทั่วแล้วใส่ลงในน้ำยาเจือจางตัวอย่าง ด้วยวิธีทำนองเดียวกับที่กล่าวมาก่อนหน้านี้แล้ว
- การตรวจผลและการตีความหมายผลการทดลอง ถ้าเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่สัมผัสอาหารซึ่งล้างน้ำยาหรือทำความสะอาดแล้ว เมื่อ swab พื้นที่ผิว 50 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 พื้นที่ พื้นที่รวม 250 ตารางเซนติเมตร ควรมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 500 โคโลนี (เฉลี่ยประมาณ 2 โคโลนี /ตารางเซนติเมตร) แสดงว่าภาชนะหรืออุปกรณ์ดังกล่าวยังทำความสะอาดไม่ดีเพียงพอ จำเป็นต้องล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ดังกล่าวใหม่

จากนั้นกดผิวหน้าอาหาร SPC agar ลงบนพื้นที่ต้องการวิเคราะห์ พยายามใช้แรงกดเท่าๆ กัน ทุกตัวอย่าง ห้ามเลื่อนจานเพาะเชื้อ ไป – มา นำจานเพาะเชื้อ ดังกล่าวบ่มเพาะเชื้อที่ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง

<u>การตรวจติดตามผล</u>

- 0-5 โคโลนี : ยอมรับได้ ในระดับดีมาก
- 6-15 โคโลนี : ยอมรับได้ ในระดับดี
- 16-30 โคโลนี : ยอมรับได้ ในระดับปานกลาง
- 31-50 โคโลนี : ไม่ยอมรับ มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ควรปรับปรุง
- >50 โคโลนี : ไม่ยอมรับ มีการปนเปื้อนในระดับสูง
- TNTC : ไม่ยอมรับ มีการปนเปื้อนในระดับสูงมาก

(A) (B)

ภาพ 4.1 ลักษณะของ RODAC plate (A), RODAC plate ที่เท SPC agar ลงใน plate (B)

4.2.10.2.4 การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์บนพื้นผิวด้วย 3M Petrifilm Disposable Plate

วิธีปฏิบัติ

อ่านขั้นตอนปฏิบัติการข้างภาชนะบรรจุ 3M-Petrifilm

A. วิธีการเตรียมแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป

1. ลักษณะแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 3M Petrifilm (ภาพ 4.1)
2. วางแผ่นเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปบนพื้นราบ ให้แผ่นฟิล์มด้านใสอยู่ข้างบน
3. ปิเปต น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร
4. เปิดแผ่นฟิล์มใสขึ้นๆ แล้วค่อยๆ หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงตรงกลางแผ่น

5. ค่อยๆ ปล่อยแผ่นฟิล์มลง ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ
6. วาง spreader ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป โดยให้ด้านเรียบคว่ำลง
7. ใช้นิ้วกดตรงกลาง spreader อย่างเบาๆ จนเห็นว่าของเหลวกระจายจนเต็มวงกลม
8. ยก spreader ออก และทิ้งแผ่นเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปไว้ 15 นาที ก่อนเคลื่อนย้าย

B. วิธีการทำ Direct Method

1. เปิดแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่เตรียมจากข้อ A และนำไปทาบลงบนพื้นผิวเป้าหมายที่ต้องการ เช่น ท่อ, พื้นผิวเรียบ, มุม ฯลฯ
2. ค่อยๆ ใช้นิ้วลูปด้านหลังแผ่น ด้านทึบ สัมผัสกับพื้นที่เป้าหมายที่ต้องการทดสอบ
3. ค่อยๆ ปิดแผ่นฟิล์ม โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ นำแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปไปบ่มที่ 32 องศาเซลเซียส นาน 24 – 48 ชั่วโมง ตรวจผลนับจำนวนโคโลนี

ภาพ 4.2 แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 3M- Petrifilm

4.2.10.2.5 การตรวจวิเคราะห์ในอากาศ ด้วยวิธี Sedimentation technique

วิธีปฏิบัติ

- เตรียม Standard Plate Count และ Acidified Potato Dextrose Agar อย่างละ 4 จานเพาะเชื้อ
- ที่เวลา 0 นาที เปิดจานเพาะเชื้อทั้ง 8 จานเพาะเชื้อ ให้สัมผัสกับอากาศ
- บ่ม SPC agar ที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ PDA ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน
- นับจำนวนจุลินทรีย์และรายงานการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอากาศเป็น CFU/หน่วยเวลา

4.2.10.2.6 การตรวจวิเคราะห์ในอากาศ ด้วยวิธี Sedimentation technique

วิธีปฏิบัติ

- ใส่แผ่น membrane filter บนชุดเครื่องกรองแบคทีเรีย
- ต่อชุดเครื่องกรองดังกล่าวเข้ากับเครื่องปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)
- ปรับอัตราการทำสุญญากาศด้วยอัตรา 40 ลิตร/นาที เป็นเวลา 0 (Control), 5, 10 และ 15 นาที เมื่อครบเวลาแต่ละช่วงที่กำหนดให้นำ membrane filter ออกจากชุดเครื่องกรอง และนำไปวางบน Standard Plate Count Agar
- บ่มเชื้อที่ 32 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีจุลินทรีย์ รายงานผลเป็น CFU/ลิตรของอากาศ

บทปฏิบัติการที่ 5

การตรวจวิเคราะห์ Coliforms bacteria และ *Escherichia coli* ในอาหาร

5.1 ความมุ่งหมาย (Purpose)

เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์ Coliform bacteria และ *Escherichia coli* ในอาหาร

5.2 การใช้งาน (Application)

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์ Coliforms bacteria และ *Escherichia coli* ในอาหาร

5.3 เอกสารอ้างอิง (References)

5.3.1 จารุวรรณ ศิริพรรณพร. (ผู้บรรยาย). (16-17 กุมภาพันธ์ 2541). เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร" สำหรับบุคลากรบริษัทวันไทยอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด. หน้า 1-11. กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

5.3.2 เรณู ปิ่นทอง. (2537). คู่มือจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 242 หน้า.

5.3.3 ศิริโฉม ทุ่งเก้า. (2543). ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา. 178 หน้า.

5.3.4 AOAC. (1995). Official Methods of Analyses of Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Associations of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.

5.3.5 Downes, F. P. and ITO, K. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington. DC. 676 p.

5.3.6 ICMSF. (1998). Microorganisms in Foods. Blackie Academic and Profession, London.

5.3.7 U .S. Food and Drug Administration. (1995). Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

5.4 นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

5.4.1 LST = Lauryl Sulphate Tryptose Broth

5.4.2 BGLB = Brilliant Green Lactose Bile Broth

5.4.3 EMB = Eosin Methylene Blue Agar

5.4.4 TSI = Triple Sugar Iron Agar

5.4.5 MPN = Most Probable Number

5.5 หลักการทางวิทยาศาสตร์ (principle)

โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Coliforms) หมายถึงกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน (rod) ไม่สร้างสปอร์เป็นพวกแอโรบส์หรือแฟคัลเททีฟ (aerobic or facultative anaerobes) หมักน้ำตาลแล็กโตสได้ผลผลิตเป็นกรดและก๊าซภายในเวลา 20 - 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae สกุลที่สำคัญ ได้แก่ Enterobacter, *Escherichia* และ Klebsiella เป็นต้น โคลิฟอร์มชนิดที่สำคัญได้แก่ *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* โดยทั่วไปพบโคลิฟอร์มได้ในแหล่งธรรมชาติ เช่น พืชผัก น้ำ ขยะ อาหารดิบ เป็นต้น นอกจากนั้นยังพบโคลิฟอร์ม บางชนิดได้ในทางเดินอาหารและลำไส้ของคน และสัตว์เลือดอุ่น อาจแบ่งโคลิฟอร์มตามแหล่งกำเนิดเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

ก. ฟีคัลโคลิฟอร์ม (fecal coliforms) หมายถึงโคลิฟอร์มที่มีแหล่งกำเนิดจากทางเดินอาหารและลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น ดังนั้นจึงใช้โคลิฟอร์มกลุ่มนี้เป็นดัชนี (indicator) ของการปนเปื้อนจากอุจจาระ และโอกาสการพบแบคทีเรียก่อโรคลำไส้ เช่น *Salmonella* และ *Shigella* ได้ ฟีคัลโคลิฟอร์มที่สำคัญได้แก่ *E. coli* สมบัติสำคัญที่ใช้จำแนกโคลิฟอร์มกลุ่มนี้ออกจากโคลิฟอร์มกลุ่มอื่นได้แก่ การเจริญที่อุณหภูมิ 44.5 $\pm$ 0.2 องศาเซลเซียส ซึ่งโคลิฟอร์มทั่วไปไม่สามารถเจริญได้

ข. นอนฟีคัลโคลิฟอร์ม (non-fecal Coliforms) หมายถึง โคลิฟอร์ม ที่ไม่ได้มีแหล่งกำเนิดมาจากลำไส้คนแต่พบได้ในแหล่งธรรมชาติ นอนฟีคัลโคลิฟอร์มที่พบได้แก่ *Enterobacter aerogenes* , *Klebsiella* sp. และ *Citrobacter* sp. เป็นต้น

5.6 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

ตาราง Most Probable Number (MPN)

5.7 ความปลอดภัย (Safety)

5.7.1 ต้องสวมเสื้อคลุมตลอดระยะเวลาปฏิบัติการเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ติดผิวหนังหรือเสื้อผ้า รวมทั้งป้องกันตัวเองและเสื้อผ้าจากการกระเด็นของสารเคมีและสิ่งสกปรกต่างๆ

5.7.2 ห้ามรับประทานอาหาร ดื่มหรือสูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนห้ามเคี้ยว หรือกัดดินสอ หรือปากกา

5.7.3 หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับหน้าหรือตาระหว่างปฏิบัติงาน

5.7.4 ก่อนและหลังปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อความสะอาดบริเวณปฏิบัติงานทุกครั้ง

5.7.5 ต้องติดฉลาก แสดง ชื่อ วันที่ ตัวอย่าง ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อหรืออื่นๆ ลงบน จานเพาะเชื้อ หรืออุปกรณ์ ทดลองเพื่อป้องกันการล้างหรือนำไปทิ้งโดยไม่ตั้งใจ

5.7.6 ใช้ตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์ด้วยความระมัดระวัง ห้ามวางตะเกียงดังกล่าวไว้ใกล้ภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์หรือสารไวไฟต่างๆ รวมทั้งระมัดระวังมือและเส้นผม หรือส่วนต่างๆ ของร่างกายจากการถูกไฟลวก ดับตะเกียงทุกครั้งเมื่อเลิกใช้งาน

5.7.7 วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม จานเพาะเชื้อ หลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปล้าง

5.7.8 สไลด์ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปกำจัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

5.7.9 ก่อนและหลังปฏิบัติการทุกครั้งต้องล้างมือด้วยสบู่ และเช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์) ทุกครั้ง

5.8.เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and supplies)

5.8.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

5.8.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

5.8.3 เครื่องวัด pH (pH meter)

5.8.4 เครื่องชั่ง (Balance)

5.8.5 เครื่องแก้ว ได้แก่ Petri dishes, Pipettes, Dilution bottle, Glass rod spreader, Test tube

5.8.6 หลอดดักก๊าซ (Durham tube)

5.8.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ควบคุมอุณหภูมิ 35 และ 44.5 องศาเซลเซียส

5.8.8 กรรไกรปลอดเชื้อ

5.8.9 ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (Stomacher bag)

5.8.10 เครื่องตีป่นผสมอาหาร (Stomacher)

5.8.11 น้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับเช็ดโต๊ะปฏิบัติการ

5.9 สารมาตรฐาน(Standard)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.9.1 Brilliant-Green Lactose Bile Broth

5.9.2 EC Broth

5.9.3 Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar)

5.9.4 Kovac's reagent

5.9.5 Lauryl Sulphate Tryptose Broth (LST)

5.9.6 Methyl red reagent

5.9.7 MR-VP Test

5.9.8 Simmons Citrate Agar

5.9.9 Tryptone water 1%

5.9.10 Voges-Proskauer reagent

5.10 วิธีดำเนินการ (Procedures)

5.10.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.10.1.1 Brilliant-Green Lactose Bile Broth

<u>ส่วนผสม</u>

- Peptone	10.0	กรัม
- Lactose	10.0	กรัม
- Oxbile dried	20.0	กรัม
- Brilliant green	0.0133	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.2 ± 0.2

<u>วิธีการเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.2 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร และใส่หลอดดักก๊าซ (Durham tube) 1 หลอด (คว่ำหลอด) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5.10.1.2 EC Broth

<u>ส่วนผสม</u>

- Peptone from casein	20.0	กรัม
- Lactose	5.0	กรัม
- Bile salt mixture	1.5	กรัม

- Sodium chloride	5.0	กรัม
- di-Potassium hydrogen phosphate	4.0	กรัม
- Potassium hydrogen phosphate	1.5	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.9 ± 0.2

<u>วิธีการเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.9 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตรและใส่หลอดหลอดดักก๊าซ (Durham tube) 1 หลอด (คว่ำหลอด) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5.10.1.3 Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar)

<u>ส่วนผสม</u>

- Peptone	10.0	กรัม
- di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
- Lactose	5.0	กรัม
- Sucrose	5.0	กรัม
- Eosin Y	0.4	กรัม
- Methylene blue	0.07	กรัม
- agar-agar	13.5	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.2 ± 0.2

<u>วิธีการเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 7.2 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เขย่าให้เข้ากันก่อนเทใส่จานเพาะเชื้อ

5.10.1.4 Kovac's reagent

<u>ส่วนผสม</u>

- p-Dimethylamino benzaldehyde	5.0	กรัม
- Amyl Alcohol	75.0	มิลลิลิตร
- Hydrochloric acid (conc)	25.0	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลาย p-Dimethylamino benzaldehyde ใน Amyl Alcohol ค่อยๆ เติม Hydrochloric acid (conc.) ลงไป เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

5.10.1.5 Lauryl Sulphate Tryptose Broth (LST)

ส่วนผสม

- Tryptose peptone	20.0	กรัม
- Lactose	5.0	กรัม
- Dipotassium phosphate	2.75	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- Sodium lauryl sulfate	0.1	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.8 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 6.8 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร และใส่หลอดดักก๊าซ (Durham tube) 1 หลอด (คว่ำหลอด) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5.10.1.6 Methyl red reagent

ส่วนผสม

- Methyl red	0.1	กรัม
- Ethanol, 95%	300.0	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลาย Methyl red 0.1 กรัม ใน Ethanol 300 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

5.10.1.7 MR-VP Test

ส่วนผสม

- Peptone from meat	7.0	กรัม
- D(+) Glucose	5.0	กรัม
- Phosphate buffer	5.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.9 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.9 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5.10.1.8 Simmons Citrate Agar

ส่วนผสม

- Ammonium dihydrogen phosphate	1.0	กรัม
- di-Potassium hydrogen phosphate	1.0	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- Sodium citrate	2.0	กรัม
- Magnesium sulfate	0.2	กรัม
- Bromthymol blue	0.08	กรัม
- Agar	13.0	กรัม
- น้ำลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.8 + 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 6.8 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางในลักษณะวุ้นเอียง

5.10.1.9 Tryptone water 1%

ส่วนผสม

- Peptone from casein	10.0	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0 $\pm$ 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5.10.1.10 Voges-Proskauer reagent

ส่วนผสม สารละลาย ก

- α -naphthol 5 .0 กรัม
- Ethanol (absolute) 100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม สารละลาย ก : ละลาย α -naphthol 5.0 กรัม ใน ethanol (absolute) 100 มิลลิลิตร

- Potassium hydroxide 40.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

วิธีการเตรียม สารละลาย ข : ละลาย Potassium hydroxide 40 กรัม ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

5.10.2 ขั้นตอนดำเนินการ

วิธีการตรวรวิเคราะห์ Coliform bacteria และ *E. coli*

การตรวจหาโคลิฟอร์มในอาหารทำได้หลายวิธี โดยอาจหาในเชิงคุณภาพ (มีหรือไม่มี) หรือเชิงปริมาณ (จำนวน) ก็ได้ สำหรับวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบันอาศัยหลักการตรวจสอบสมบัติสำคัญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ซึ่งได้แก่ การเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน หมักแล็กโทส ได้กรดและก๊าซภายใน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบว่าโคลิฟอร์มที่พบเป็น *E. coli* หรือไม่ ต้องทำการทดสอบทางชีวเคมีที่จำเพาะต่อไปอีก

วิธีเอ็มพีเอ็น (Most Probable Number, MPN method) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้หาปริมาณโคลิฟอร์ม และ *E. coli* วิธีนี้อาจเรียกว่าวิธี multiple tube fermentation เนื่องจากมีขั้นตอนคือ เพาะเลี้ยงตัวอย่างความเจือจางหลายๆ ระดับติดต่อกันด้วยชุดของอาหารเหลวที่เหมาะสม โดยทั่วไปมักเพาะเลี้ยงตัวอย่างความเจือจาง 3 ระดับติดต่อกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเจือจางละ 3, 5 หรือ 10 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลอดที่มีการเจริญของโคลิฟอร์มซึ่งสังเกตได้จากความขุ่นและฟองก๊าซของอาหารเลี้ยงเชื้อ อ่านผลเป็น *หลอดผลบวก*(+) ส่วนหลอดที่ไม่ให้ผลการทดสอบดังกล่าวอ่านผลเป็น *หลอดผลลบ*(-) ค่าจำนวนหลอดผลบวกจากทุกระดับความเจือจางนำไปอ่านค่าจากตารางมาตรฐาน ที่เรียกว่า ตารางเอ็มพีเอ็น (MPN table) ซึ่งเป็นค่าปริมาณโคลิฟอร์มในตัวอย่าง หน่วยเป็นเอ็มพีเอ็นต่อกรัม (กรณีตัวอย่างเป็นอาหาร) หรือ เอ็มพีเอ็นต่อ 100 มิลลิลิตร (กรณีตัวอย่างเป็นน้ำหรือเครื่องดื่ม) สำหรับการหาปริมาณ *E. coli* โดยวิธีเอ็มพีเอ็นมีวิธีการเช่นเดียวกับการหาปริมาณโคลิฟอร์ม แต่ต้องใช้การทดสอบเพิ่มเติมโดยแบ่งขั้นของการทดสอบเป็น 3 ขั้น ดังนี้

1. การทดสอบขั้นต้น (presumptive test) เป็นการตรวจสอบสมบัติในการหมักแล็กโทสได้กรดและก๊าซของโคลิฟอร์ม โดยเพาะเลี้ยงตัวอย่างด้วยอาหารเหลวที่มีแล็กโทสเป็นส่วนประกอบ เช่น Lauryl Sulphate Tryptose Broth หรือ Lactose Broth ที่มีหลอดดักก๊าซ (Durham tube) ซึ่งเป็นหลอดแก้วขนาดเล็กวางคว่ำอยู่ด้วย หลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซภายในเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อ่านผลเป็นหลอดผลบวก อย่างไรก็ตามขั้นตอนนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ที่พบเป็นโคลิฟอร์ม ทั้งนี้เนื่องจากอาจมีจุลินทรีย์อื่นที่ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบขั้นยืนยันต่อไป

2. **การทดสอบขั้นยืนยัน (confirm test)** ขั้นนี้เป็นการทดสอบเพื่อยืนยันผลของโคลิฟอร์ม โดยถ่ายตัวอย่างที่ให้ผลบวกในขั้นต้นลงในอาหารเหลว Brilliant Green Lactose Bile Broth ซึ่งมีแล็กโทสเป็นส่วนประกอบ รวมทั้งมี Brilliant Green และ Bile ที่ช่วยยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก สำหรับโคลิฟอร์มซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบนั้นจะเจริญได้และทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น

และเกิดฟองก๊าซภายในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง ซึ่งอ่านผลเป็นหลอดผลบวก สำหรับหลอดที่ไม่ให้ผลการทดสอบดังกล่าวให้ถือเป็นหลอดผลลบ

การอ่านผลปริมาณโคลิฟอร์ม

ผลของจำนวนหลอดผลบวกที่พบจากทุกความเจือจางในขั้นยืนยัน นำไปอ่านค่าปริมาณ โคลิฟอร์มได้จากตารางเอ็มพีเอ็น

หมายเหตุ ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบฟีคัลโคลิฟอร์ม ให้ถ่ายเชื้อจากหลอดผลบวกในขั้นต้นลงในอาหารเหลว *E. coli* (EC) broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ถ้ามีการเจริญของฟีคัลโคลิฟอร์มจะเกิดก๊าซภายในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง

3. การทดสอบขั้นสมบูรณ์ (complete test) ขั้นนี้เป็นการตรวจสอบว่าโคลิฟอร์มที่พบในขั้นยืนยันเป็น *E. coli* หรือไม่ โดยนำหลอดผลบวก BGLB broth ที่ให้ผลบวกมาขีดแยกเชื้อบนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue (EMB) agar บ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าพบโคโลนีลักษณะ แบน ขนาด 2-3 มิลลิเมตร ผิวไม่เยิ้ม มีจุดสีเข้ม ผิวโคโลนีมีสีเขียวเหลือบแสง ซึ่งเรียกลักษณะการเหลือบแสงเช่นนี้ว่า เงาโลหะ (metallic sheen) ซึ่งเป็นโคโลนีลักษณะเฉพาะของ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ ให้นำมาทำการทดสอบต่อขั้นต่อไป

(1) ทดสอบสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญของ *E. coli* ด้วยชุดการทดสอบที่เรียกว่า IMViC ซึ่งเป็นคำย่อที่ได้จากอักษรตัวแรกของชื่อการทดสอบ 4 การทดสอบย่อย ดังนี้

** I มาจาก Indole test หรือการทดสอบอินโดล

** M มาจาก methyl red test หรือการทดสอบเอ็มอาร์

** V มาจาก Voges-Proskauer test หรือการทดสอบวีพี

** C มาจาก citrate utilization test หรือการทดสอบการใช้ซิเทรต

โดย *E. coli* และ *Enterobacter aerogenes* ให้ผลการทดสอบ IMViC ดังนี้

แบคทีเรีย	I	M	V	C
E. coli type I*	+	+	-	-
E. coli type II	-	+	-	-
En. aerogenes	-	-	+	+

หมายเหตุ + หมายถึงให้ผลบวกกับการทดสอบ

\- หมายถึงให้ผลลบกับการทดสอบ

* หมายถึง *E. coil* สายพันธุ์ที่พบมาก

(2) เพาะเชื้อบนอาหารแข็ง Nutrient Agar เมื่อเจริญแล้วนำมาย้อมแกรม เพื่อตรวจดูว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนหรือไม่ พร้อมทั้งเพาะเชื้อลงอาหารเหลว Lauryl Sulphate Tryptose Broth ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง เพื่อยืนยันการผลิตก๊าซจากแล็กโทส

ตัวอย่างการอ่านค่าเอ็มพีเอ็น

	จำนวนหลอด		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
lauryl sulphate tryptose broth	3	3	3
lauryl sulphate tryptose broth ผลบวก	3	2	1
BGLB broth ผลบวก	2	1	0

อ่านค่าปริมาณโคลิฟอร์มจากตารางได้ 15 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม

EC broth ผลบวกของ *E. coli*	1	1	0

อ่านค่าปริมาณ *E. coli* จากตารางได้ 7 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม

5.10.2.1 วิธีการตรวจ Coliform bacteria และ *E. coli* ในอาหาร โดยเทคนิค Most Probable Number Technique (MPN)

ก. การทดสอบขั้นต้น

1. ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดตัวอย่างให้ละเอียด

2. ชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลายเปบโตนปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในถุงตัวอย่างนำไปตีผสมด้วยเครื่องเป็นเวลา 60 นาที จะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1}

3. ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1} ลงในหลอดอาหาร LST broth 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร

4. ใช้ปิเปตอันใหม่ถ่ายตัวอย่างความเจือจาง 10^{-2} ลงในหลอดเปบโตน 9 มิลลิลิตร อีกหลอดหนึ่งผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-3} และใช้ปิเปตอันเดิมถ่ายตัวอย่างความเจือจาง 10^{-2} ลงในอาหาร LST broth อีก 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร

5. ใช้ปิเปตอันใหม่ถ่ายตัวอย่างความเจือจาง 10^{-3} ลงในอาหาร LST Broth อีก 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร

6. บ่มหลอด LST broth ที่มีตัวอย่าง (รวมทั้งหมด 9 หลอด ต่อ 1 ตัวอย่าง) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อ่านผลครั้งแรกหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญจากความขุ่นและสังเกตการผลิตก๊าซจนการเกิดฟองอากาศ ในอาหารเลี้ยงเชื้อและมีที่ว่างในหลอดดักก๊าซ บ่มหลอด ที่ไม่ให้ผลบวกต่ออีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลเช่นเดียวกันอีกครั้งหนึ่ง

ข. การทดสอบขั้นยืนยันสำหรับ Coliforms bacteria

1. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายจากหลอด LST broth ที่ให้ผลบวกลงในหลอดอาหาร BGLB broth ทำเช่นเดียวกันจนครบทุกหลอดบวก

2. บ่มหลอด LST broth ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจผลหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลอดที่อ่านผลเป็น ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่น และเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลอมเหลือง และมีที่ว่างในหลอดดักก๊าซมากกว่า 1/10 ของปริมาตรหลอดดักก๊าซ

3. นำค่าจำนวนหลอด LST broth ที่ให้ผลบวกจากทุกความเจือจางไปอ่านค่าปริมาณ Coliforms bacteria จากตารางเอ็มพีเอ็น *(ภาคผนวก)* จะได้ ค่าเอ็มพีเอ็นต่อตัวอย่าง 1 กรัม

ค. การทดสอบขั้นยืนยันสำหรับ *E. Coli*

1. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายจากหลอด LST broth ที่ให้ผลบวกลงในหลอดอาหาร EC broth ทำเช่นเดียวกันจนครบทุกหลอด

2. บ่มหลอด EC broth ที่อุณหภูมิ 45.5 องศาเซลเซียส ตรวจผลหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลอดที่อ่านผลเป็น ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่น และมีที่ว่างในหลอดดักก๊าซ

3. นำค่าจำนวนหลอด EC broth ที่ให้ผลบวกจากทุกความเจือจางไปอ่านค่าปริมาณ *E. coli* จากตารางเอ็มพีเอ็นของ *E. coli* ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

ค. การทดสอบขั้นสมบูรณ์สำหรับ *E. coli*

1. นำหลอด EC broth ที่ให้ผลบวกแต่ละหลอดมาขีดแยกเชื้อลงบนจานอาหารแข็ง EMB agar บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *E. coli* บน EMB agar (โคโลนีแบนไม่เยิ้มมีจุดสีเข้ม มีเงาโลหะ) ซึ่งถือเป็นผลบวก

3. ทำการทดสอบ IMViC TEST

การทดสอบ IMViC

1. การทดสอบอินโดล

1.1 เพาะโคโลนีลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ 1% Typtone broth

1.2 บ่มจานเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเวียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3 เติมสารละลายโคแวคส์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอด เขย่าเบา ๆ

ผลของ *E. coli* เกิดชั้นสีแดงด้านบนของชั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ (ผลบวก)

2. การทดสอบเอ็มอาร์

2.1 เพาะโคโลนีลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MR – VP broth

2.2 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 –72 ชั่วโมง

2.3 เติมสารละลายเมทิลเรด 5 หยด ลงในหลอด เขย่าแรง ๆ

ผลของ *E. coli* อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง (ผลบวก)

3. การทดสอบวีพี

3.1 เพาะโคโลนีลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MR – VP broth

3.2 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3 เติมสารละลายแอลฟาแนฟทอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอด

ผลของ *E. coli* อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนเป็นสีแดง ภายใน 30 นาที (ผลลบ)

4. การทดสอบการใช้ซิเทรต

4.1 เพาะโคโลนีลงในอาหารเอียง Simmons Citrate Agar โดยขีดลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ

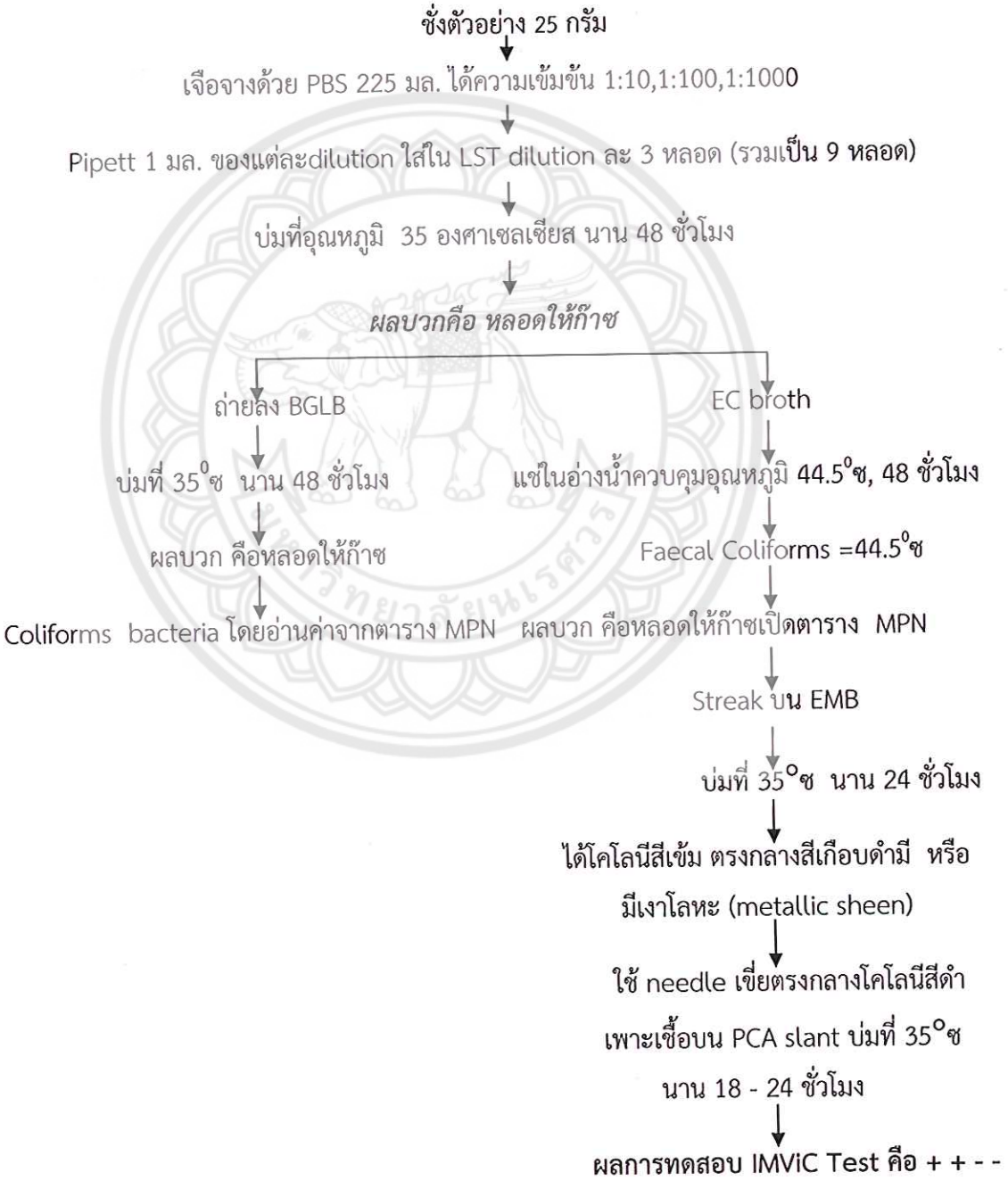
4.2 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลของ *E. coli* อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเขียวเช่นเดิม (ผลลบ)

3. นำโคโลนีที่ให้ผลการทดสอบ IMViC เป็น + + - - มาทำการย้อมแกรม และทดสอบการหมักแล็กโทส ใน LST broth ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

4. นำค่าจำนวนหลอด BGLB broth จากทุกความเจือจางที่ให้ผลการทดสอบเพิ่มเติมเหล่านี้ของ *E. coli* ไปอ่านค่าปริมาณ *E. coli* จากตารางเอ็มพีเอ็น ซึ่งจะได้ ค่าเอ็มพีเอ็นของ *E. coli* ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

5.10.2.1 การตรวจวิเคราะห์ Coliforms bacteria ในอาหาร โดยวิธี Most Probable Number Technique (MPN) แสดงดังภาพ 5.1



ภาพ 5.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ Coliforms bacteria ในอาหาร โดยวิธีเอ็มพีเอ็น

5.10.2.2 วิธีการตรวจ Coliforms bacteria ในอาหาร โดยการนับโคโลนี แสดงดังภาพ 5.2

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม

↓

เจือจางด้วย PBS 225 มล. ได้ความเข้มข้น 1:10,1:100,1:1000

↓

Pipett 1 มล. ของแต่ละ dilution ลงจานเพาะเชื้อ (ทุก dilution ทำ 2 plate)

↓

เท 10 มล. VRBA
ลงในจานเพาะเชื้อ เขย่าให้ทั่ว และวางทิ้งไว้ให้แข็ง

↓

เททับหน้าด้วย 10 มล. ของ VRBA และทิ้งไว้ให้แข็ง

↓

กลับจานเพาะเชื้อ และบ่มเพาะเชื้อที่ 35^0ซ นาน 18 – 24 ชั่วโมง

↓

นับโคโลนีที่มีสีแดงคล้ำ เส้นผ่าศูนย์กลางไม่ต่ำกว่า 0.5 มม.

↓

ทดสอบยืนยันโดย ถ่ายเชื้อลงใน BGLB
บ่มเพาะเชื้อที่ 35^0ซ นาน 48 ชั่วโมง เพื่อดูการเกิดก๊าซ

ภาพ 5.2 ขั้นตอนการตรวจ Coliforms bacteria ในอาหาร โดยการนับโคโลนี

การคำนวณ จำนวนโคลิฟอร์มต่อกรัม คิดจาก % ของหลอดที่ให้ก๊าซจาก BGLB แล้วจึงคำนวณกลับไปยัง plate ของ VRBA คูณด้วย dilution factor

การรายงานผล จำนวนโคโลนีต่อกรัม

หมายเหตุ ถ้าต้องการตรวจนับ Faecal Coliform ให้นำจานเพาะเชื้อ ไปบ่มเพาะเชื้อที่ 44.5^0ซ แล้วดำเนินการตามขั้นตอน เช่นเดียวกันกับการตรวจนับ Coliform bacteria

5.10.2.3 วิธีการตรวจ *E. coli* ในอาหารโดยการนับโคโลนี แสดงดังภาพ 5.3

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม

↓

เจือจางด้วย PBS 225 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 1:10,1:100,1:1000

↓

Pipett 1 มิลลิลิตร ของแต่ละ dilution ลงจานเพาะเชื้อ (ทุก dilution ทำ 2 plate)

↓

เท 15 มิลลิลิตร ของ Chromocult Coliform-Agar
ลงในจานเพาะเชื้อเขย่าให้ทั่ว และวางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว

↓

กลับจานเพาะเชื้อ และบ่มเพาะเชื้อที่ 35^0ซ นาน 18 – 24 ชั่วโมง

↓

นับโคโลนีที่มีสีม่วง (pueple-blue colony) ในจานเพาะเชื้อ ที่มี 30 – 300 โคโลนี

↓

ทดสอบยืนยันโดย streak เชื้อบน EMB agar
บ่มเพาะเชื้อที่ 35^0ซ หรือ 45.5^0ซ นาน 24 ชั่วโมง
ดูโคโลนีที่มี metallic sheen พร้อมทั้งทำ IMViC Test ด้วย

ภาพ 5.3 ขั้นตอนการตรวจ *E. coli* ในอาหารโดยการนับโคโลนี

การคำนวณ นับจำนวนที่นับได้ทั้งหมดคูณด้วย dilution factor

การรายงานผล จำนวน *E. coli* ต่อกรัม

บทปฏิบัติการที่ 6
การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในอาหาร

6.1 ความมุ่งหมาย (Purpose)

เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในอาหาร

6.2 การใช้งาน (Application)

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในอาหาร

6.3 เอกสารอ้างอิง (References)

6.3.1 มาลัย บุญรัตนกรกิจ. (ผู้บรรยาย). (16 - 17 กุมภาพันธ์ 2541). เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร" สำหรับบุคลากรบริษัทวันไทยอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด. หน้า 37- 54. กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

6.3.2 บุญส่ง แสงอ่อน. (2547). จุลชีววิทยาทางอาหารภาคปฏิบัติการ. คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก. 76 หน้า.

6.3.3 เรณู ปิ่นทอง. (2537). คู่มือจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 231 หน้า.

6.3.4 ศิริโฉม ทุ่งเก้า. (2543). ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา. 158 หน้า.

6.3.5 Andrews, W. H., Jacobson, A. and Hammack ,T. S. (2002) . **Bacteriological Analytical Manual** (BAM) [online] สืบค้นจาก :http :// www.fda.gov/ Food/ Science Research/Laboratory Methods/ Bacteriological Analytical Manual BAM/ ucm071429.htm เมื่อวันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2556

6.3.6 AOAC. (1995). **Official Methods of Analyses of Association of Official Analytical Chemists.** 16th ed. Associations of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.

6.3.6 Downes, F. P. and ITO, K. (2001). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 4th ed. American Public Health Association, Washington. DC. 676 p.

6.3.7 ICMSF. (1998). **Microorganisms in Foods.** Blackie Academic and Profession, London.

6.3.8 Internation Organization for Standardization ISO 6579. **Microbiological of food and and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of Salmonella spp.** 1st. Geneva. International Organization for Standardization (ISO); 2004.

6.3.9 Kauffmann F. **Classification of bacteria : a realistic scheme with special reference to the classification of *Salmonella* and *Escherichia* species. Copenhagen** : Munksgaard; 1975.

6.3.10 U .S. Food and Drug Administration. (1995). **Bacteriological Analytical Manual.** 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

6.4 นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

6.4.1 LB = Lactose Broth

6.4.2 BS = Bismuth Sulfite Agar

6.4.3 BG = Brilliant Green Agar

6.4.4 LIA = Lysine Iron Agar

6.4.5 TSI = Triple Sugar Iron Agar

6.4.6 BPLS agar = Brilliant-Green Phenol-Red lactose Sucrose Agar

6.4.7 rough = หมายถึงเชื้อที่มีลักษณะผิวโคโลนีไม่เรียบ

6.5 หลักการทางวิทยาศาสตร์ (principle)

Salmonella เป็นเชื้ออยู่ในกลุ่ม Enteric bacteria ในสกุล Enterobacteriaceae เชื้อตัวนี้พบได้ทุกหนแห่งทั่วโลก พบทั้งในคน สัตว์เลี้ยง สัตว์ทั่วๆ ไป และพบว่ามีการปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่ม *Salmonella* จึงเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร เช่น การระบาดของโรคท้องร่วง เป็นอันดับหนึ่งในเกือบทุกประเทศ *Salmonella* ได้ถูกจัดกลุ่มโดยอาศัย Somatic (O) Capsula (K) และ Flagella (H) ag ตามวิธีการของ kauffmsn และ white ออกเป็นจำนวนมากกว่า 2,000 species ต่อมา Ewing ได้ทำการจำแนกเชื้อในกลุ่ม *Salmonella* เสียใหม่โดยแยกเป็นเพียง 3 species คือ *S. choleraesuis, S. typhi และ S. enteritidis* ส่วน *Salmonella species* อื่นๆ ถูกจัดเป็น serotype โดยที่ 2 species แรกจะมีเพียงอย่างละ 1 serotype ขณะที่ *S. enteritidis* จะแบ่งออกได้เป็นจำนวนมากกว่า 2,000 serotype

สัณฐานวิทยา

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ มีขนาด 0.7-1.5 ไมครอน ยาว 2.0 ไมครอน เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่สร้างแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลเจลลาที่อยู่รอบๆ เซลล์ มีบางสายพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์จึงไม่

สามารถเคลื่อนไหวได้ เช่น *S. gallinarum* และ *S. pullorum* เชื้อ *Salmonella* มีความสามารถสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์แตกต่างกัน มีบางสายพันธ์ที่ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ เช่น *S. enteritidis* , *S. paratyphi A* , *S. choleraesuis* ฯลฯ สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบง่ายๆ ทั่วไป สร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส และแมนนิทอลได้ แต่ไม่สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลซูโครส แลคโทส และซอร์โบสได้ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 - 4 มิลลิลิตร ขอบเรียบ ผิวมัน ไม่มีสี อุณหภูมิที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 37 - 45 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิที่เจริญได้ดีที่สุดคือ 42 องศาเซลเซียส เจริญได้ในช่วง pH 4.5 - 9.0 แต่ pH ที่เหมาะสมในการเจริญจะอยู่ในช่วง 6.5 - 7.5 เชื้อ *Salmonella* ไม่ทนความร้อน ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที หรือที่ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที การใช้ความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำไม่สามารถทำลาย *Salmonella* ได้เพียงแต่ไปยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่านั้น (มาลัย : การปนเปื้อน การควบคุมและการตรวจวินิจฉัย *Salmonella* , หน้า 37)

การทำให้เกิดโรค

การเกิดโรคจากเชื้อ *Salmonella* จำแนกออกเป็น 3 แบบ คือ

1. Enteric fever เป็นโรคที่มีไข้สูง ซึ่งได้แก่ ไข้รากสาด หรือ ไทฟอยด์ (typhoid fever) และไข้รากสาดน้อย หรือ พาราไทฟอยด์ (paratyphoid fever) ลักษณะของไข้ไทฟอยด์ มีสาเหตุมาจากเชื้อ *S. typhi* เป็นโรคที่แสดงอาการรุนแรงที่สุดที่เกิดจากแบคทีเรียสกุลนี้ เชื้อปนเปื้อนกับอาหารหรือน้ำดื่มที่รับประทานเข้าไป จะผ่านลำไส้เล็กแล้วเข้าสู่กระแสเลือด กระจายสู่อวัยวะต่างๆ ผู้ป่วยจะมีอาการอ่อนเพลีย ปวดศีรษะ มีไข้สูงเป็นเวลานาน ไอ เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย หรือท้องผูก ชีพจรเต้นช้า ม้ามโต มีเลือดกำเดาไหล เลือดออกเป็นจุดๆ ใต้ผิวหนังบริเวณหน้าตาและลำตัว เหงื่อออกมาก ตัวสั่น และถ้าอาการรุนแรงอาจถ่ายเป็นเลือด โรคนี้มีระยะฟักตัวของเชื้อประมาณ 2 สัปดาห์ หรือ 7 - 28 วัน ส่วนไข้พาราไทฟอยด์มีลักษณะการเกิดโรคและอาการคล้ายโรคไทฟอยด์ มีอาการรุนแรงน้อยกว่า มีระยะฟักตัวสั้นกว่าและมีไข้ต่ำกว่า เชื้อที่เป็นสาเหตุคือ *S. paratyphi*

2. Septicemia เชื้อเข้าสู่กระแสโลหิตโดยตรง สามารถตรวจพบเชื้อในกระแสโลหิต โดยไม่มีอาการของโรคอุจจาระร่วง ผู้ป่วยมีอาการเป็นไข้สูงเป็นระยะๆ ตับและม้ามโต น้ำหนักลด เชื่องซึม อาจทำให้เกิดอาการปอดบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เชื้อที่เป็นสาเหตุได้แก่ *S. choleraesuis*

3. Gastroenteritis เชื้อ *Salmonella* ส่วนมากจะทำให้เกิดอาการชนิดที่ 3 นี้ โดยเชื้อติดเข้าไปกับอาหารประเภท เนื้อสัตว์ ไข่ นม และอื่นๆ เมื่อผู้ป่วยรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป เชื้อจะแทรกเข้าไปอยู่ในเยื่อบุลำไส้ใหญ่ และลำไส้เล็กส่วนกลาง ระยะฟักตัวของเชื้อประมาณ 8 - 24 ชั่วโมง ผู้ป่วยมีอาการ ปวดท้องอย่างรุนแรง มีไข้ต่ำ อุจจาระร่วง หนาวสั่น ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย (มาลัย : การปนเปื้อน การควบคุมและการตรวจวินิจฉัย *Salmonella* , หน้า 38)

6.6 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

-

6.7 ความปลอดภัย (Safety)

6.7.1 ต้องสวมเสื้อคลุมตลอดระยะเวลาปฏิบัติการเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ติดผิวหนังหรือเสื้อผ้า รวมทั้งป้องกันตัวเองและเสื้อผ้าจากการกระเด็นของสารเคมีและสิ่งสกปรกต่างๆ

6.7.2 ห้ามรับประทานอาหาร ดื่มหรือสูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนห้ามเคี้ยว หรือกัดดินสอปากกา

6.7.3 หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับหน้าหรือตาระหว่างปฏิบัติงาน

6.7.4 ก่อนและหลังปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ เพื่อความสะอาดบริเวณปฏิบัติงานทุกครั้ง

6.7.5 ต้องติดฉลาก แสดง ชื่อ วันที่ ตัวอย่าง ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อหรืออื่นๆ ลงบน จานเพาะเชื้อหรืออุปกรณ์ ทดลองเพื่อป้องกันการล้างหรือนำไปทิ้งโดยไม่ตั้งใจ

6.7.6 ใช้ตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์ด้วยความระมัดระวัง ห้ามวางตะเกียงดังกล่าวไว้ใกล้ภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์หรือสารไวไฟต่างๆ รวมทั้งระมัดระวังมือและเส้นผม หรือส่วนต่างๆ ของร่างกายจากการถูกไฟลวก ดับตะเกียงทุกครั้งเมื่อเลิกใช้งาน

6.7.7 วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม จานเพาะเชื้อหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปล้าง

6.7.8 สไลด์ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปกำจัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

6.7.9 ก่อนและหลังปฏิบัติการทุกครั้งต้องล้างมือด้วยสบู่ และเช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (แอลกอออล์ 70 เปอร์เซ็นต์) ทุกครั้ง

6.8 เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and supplies)

6.8.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณภูมิ 35 และ 42 องศาเซลเซียส

6.8.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

6.8.3 เครื่องวัด pH (pH meter)

6.8.4 เครื่องชั่ง (Balance)

6.8.5 เครื่องแก้ว ได้แก่ Petri dishes, Pipette, Dilution bottle, Glass rod spreader

6.8.6 รางแช่ปิเปต

6.8.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

6.8.8 กรรไกรปลอดเชื้อ

6.8.9 เครื่องตีผสมอาหาร (Stomacher)

6.8.10 ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (Stomacher bag)

6.8.11 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

6.9 สารมาตรฐาน (Standard)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

6.9.1 อาหารเหลวชนิดไม่คัดเลือก (Nonselective media for enrichment and propagation)

a. Lactose Broth (LB)

b. Trypticase (Trytic) Soy Broth (TSB)

c. Nutrient Broth (NB)

d. Bufferd Peptone Water (BPW)

อาหารเหลวชนิดไม่คัดเลือกนี้มีความจำเป็นสำหรับตัวอย่างอาหารแห้งหรืออาหารที่ผ่านกรรมวิธีแปรรูป เช่น ไข่ผง เนยแข็ง นมผง ผักและผลไม้แช่เยือกแข็ง อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ไม่มีส่วนผสมที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ แต่ช่วยทำให้เซลล์ *Salmonella* ที่อ่อนแอหรือบาดเจ็บฟื้นตัวขึ้น

6.9.2 อาหารเหลวชนิดคัดเลือก (Selective enrich media)

a. Selenite Cystine Broth (SC)

b. Tetrathionate Broth (TT)

c. Rappaport Vassiliadis (RV)

อาหารเหลวชนิดคัดเลือกเป็นอาหารเหลวที่ถ่ายเชื้อจากอาหารเหลวชนิดไม่คัดเลือกมาลงหรืออาจเพาะเชื้อโดยตรงจากตัวอย่างที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของ *Salmonella* สูง เช่น เนื้อดิบหรือขยะ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ซึ่งมีส่วนประกอบที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของ *Salmonella* และมีส่วนประกอบที่ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น

6.9.3 อาหารแข็งชนิดคัดเลือก (Selective isolation media)

a. Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar

b. Hektoen Enteric (HE) Agar

c. Bismuth Sulfite (BS) Agar

d. Brilliant Green (BG) Agar

e. Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV)

f. Rambach (Rm) Agar

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะแยก *Salmonella* มักมีส่วนประกอบของสี (dyes) เกลือน้ำดี (bile salts) และสารประกอบบางชนิดที่ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น และมีส่วนประกอบที่ใช้แสดงสมบัติของ *Salmonella* เช่น การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ และการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นต้น เมื่อ *Salmonella* เจริญบนอาหารแข็งสำหรับเพาะแยก *Salmonella* จะให้โคโลนีลักษณะเฉพาะ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้มีระดับความแรงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไม่เท่ากัน ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงเลือกใช้อาหารแข็งเหล่านี้อย่างน้อย 2 ชนิด ที่มีระดับการยับยั้งต่างกัน เพื่อทำให้โอกาสในการแยกเชื้อ *Salmonella* สูงขึ้น (ศิริโฉม, 2543)

6.9.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี (Media for biochemical characterization of isolate)

a. Triple Sugar Iron (TSI) Agar
b. Lysine Indole Motility medium (LIM)
c. Lysine Iron Agar (LIA)
d. MR-VP Broth
e. Simmons Citrate Agar
f. Urea Broth
g. Malonate Broth

6.10 วิธีดำเนินการ (Procedures)

6.10.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

6.10.1.1 BSA (Bismuth Sulfite Agar)

<u>ส่วนผสม</u>

- Meat extract	5.0	กรัม
- Peptone from meat	10.0	กรัม
- D(+) Glucose	5.0	กรัม
- di-Sodium hydrogen phosphate	4.0	กรัม
- Iron (III)sulfate	0.3	กรัม
- Brilliant green	0.025	กรัม
- Bismuth sulfite indicator	8.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
- Agar	15.0	กรัม

pH : 7.6 $\pm$ 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 7.6 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ต้มจนเดือดนานประมาณ 10 นาที (ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ) เทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แข็งตัว

6.10.1.2 BPLS Agar (Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose Agar)

ส่วนผสม

- Peptone from meat	10.0	กรัม
- Meat extract	5.0	กรัม
- Yeast extract	3.0	กรัม
- di-Sodium hydrogen phosphate	1.0	กรัม
- Sodium dihydrogen phosphate	0.6	กรัม
- Lactose	10.0	กรัม
- Sucrose	10.0	กรัม
- Phenol red	0.09	กรัม
- Brilliant green	0.0047	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
- Agar	12.0	กรัม

pH 7.2 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอชเป็น 7.2 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้แข็งตัว

6.10.1.3 HEA (Hektoen Enteric Agar)

ส่วนผสม

- Peptone from meat	15.0	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- Yeast extract	3.0	กรัม
- Sucrose	14.0	กรัม
- Lactose	14.0	กรัม
- Salicin	2.0	กรัม
- Sodium thisulfate	5.0	กรัม
- Ammonium iron(III) citrate	1.5	กรัม

- Bile salt mixture	2.0	กรัม
- Bromothymol blue	0.05	กรัม
- Acidic fuchsin	0.08	กรัม
- Agar	13.5	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.7 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 7.7 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ต้มจนเดือดนานประมาณ 10 นาที (ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ) เทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร

6.10.1.4 LB (Lactose Broth)

ส่วนผสม

- Peptone from meat	5.0	กรัม
- Meat extract	3.0	กรัม
- Lactose	5.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.9 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 6.9 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุขวดแก้วปริมาตร 225 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6.10.1.5 LIA Slant (Lysine Iron Agar)

ส่วนผสม

- Peptone	5.0	กรัม
- Yeast extract	3.0	กรัม
- Glucose	1.0	กรัม
- L- lysine hydrochloride	10.0	กรัม
- Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
- Sodium thiosulphate	0.04	กรัม
- Bromcresol purple	0.02	กรัม
- Agar	15.00	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.7 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอชเป็น 6.7 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 X 100 มิลลิลิตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางหลอดในลักษณะอาหารเอียง

6.10.1.6. LIM (Motility Indole Lysine Medium)

ส่วนผสม

- Peptone	10.0	กรัม
- Tryptone	10.0	กรัม
- Yeast extract	3.0	กรัม
- L- lysine hydrochloride	10.0	กรัม
- Dextrose	1.0	กรัม
- Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
- Sodium thiosulphate	0.04	กรัม
- Bromcresol purple	0.02	กรัม
- Agar	2.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.6 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอชเป็น 6.7 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 X 100 มิลลิลิตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6.10.1.7 MSRV (Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis)

ส่วนผสม

- Tryptose	4.59	กรัม
- Casein hydrolysate	4.59	กรัม
- Sodium chloride	7.34	กรัม
- Potassium dihydrogen phosphate	1.47	กรัม
- Magnesium chloride anhydrous	10.93	กรัม
- Malachite green	0.037	กรัม
- Agar	2.7	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

Novobiocin Antimicrobic Supplement

- Sodium Novobiocin 0.020 กรัม

pH 5.6 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 5.6 ต้มจนเดือดนานประมาณ 10 นาที (ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ) ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 – 45 องศาเซลเซียส เติม Novobiocin Antimicrobic Supplement 10 มิลลิลิตรก่อน เทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร

6.10.1.8 Malonate Broth

ส่วนผสม

- Yeast extract 1.0 กรัม
- Ammonium sulfate 2.0 กรัม
- Dipotassium phosphate 0.6 กรัม
- Monopotassium phosphate 0.4 กรัม
- Sodium chloride 2.0 กรัม
- Dextrose 0.25 กรัม
- Bromthymol blue 0.025 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 6.0 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 16 X 150 มิลลิลิตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6.10.1.9 MR-VP Borth (Methyl-red Veges-Porskauer Broth)

ส่วนผสม

- Peptone 5.0 กรัม
- D(+)glucose 5.0 กรัม
- Dipotassium hydrogen phosphate 5.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 6.9 ±0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.9 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 X 100 มิลลิลิตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6.10.1.10 น้ำยาทดสอบ Methyl red

ส่วนผสม

- methyl red 0.04 กรัม
- Absolute ethanol 60.0 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH 5.0 สารละลายจะมีสีส้ม

6.10.1.11 น้ำยาทดสอบ VP

ส่วนผสม O'merra's reagent

- Potassium hydroxide 40.0 กรัม
- น้ำกลั่น 100.0 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายสารละลายให้เข้ากัน รอให้เย็น จากนั้นเติม creatine monohydrate 0.3 กรัม แล้วละลายให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บได้นาน 4 สัปดาห์

6.10.1.12 สารละลาย Copper sulfate ตามวิธีการของ Leifson

ส่วนผสม

- Copper sulfate 1.0 กรัม
- Concentrated ammonia 40.0 มิลลิลิตร
- 10% KOH 690.0 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลาย Copper sulfate 1 กรัมลงใน Concentrated ammonia 40 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 10% KOH 690 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

6.10.1.13 Barritt's reagent

ส่วนผสม

- 1 – naphthol	5	กรัม
- Absolute ethanol	100	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน บรรจุใส่ขวดสีชา

6.10.1.13 RVS (Rappaport-VASSILIADIS) Broth

ส่วนผสม

- Casein hydrolysate	4.45	กรัม
- Sodium chloride	7.2	กรัม
- Monopotassium phosphate	1.45	กรัม
- Magnesium chloride anhydrous	13.4	กรัม
- Malachite green	0.037	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.6 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.6 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 16 X 150 มิลลิลิตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6.10.1.14 Simmon's Citrate Agar

ส่วนผสม

- Ammonium dihydrogen phosphate	1.0	กรัม
- Di-potassium hydrogen phosphate	1.0	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- Sodium citrate	2.0	กรัม
- Magnesium sulfate	0.2	กรัม
- Bromthymol blue	0.08	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.6 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับ pH เป็น 6.6 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 X 100 มิลลิลิตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางหลอดในลักษณะอาหารเอียง

6.10.1.15 Selenite Cystine Broth

ส่วนผสม

- Tryptone	4.0	กรัม
- Lactose	4.0	กรัม
- Sodium hydrogen selenite	4.0	กรัม
- Disodium hydrogen phosphate	5.0	กรัม
- Potassium dihydrogen phosphate	5.0	กรัม
- L-Cystine	0.01	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ต้มจนเดือดเป็นเวลานาน 10 นาที (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ) บรรจุหลอดแก้วขนาด 15 X 150 มิลลิลิตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร

6.10.1.16 Tetrathionae Broth (TT)

ส่วนผสม

- Peptone from casein	2.5	กรัม
- Peptone from meat	2.5	กรัม
- Bile salt mixture	1.0	กรัม
- Calcium carbonate	10.0	กรัม
- Sodium thiosulfate	30.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เตรียมสารละลาย Iodine

- Potassium iodine	5.0	กรัม
- Iodine	6.0	กรัม
- น้ำกลั่น	20.0	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม ละลาย Iodine 6.0 กรัมใน Potassium iodine 5.0 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย 0.1% Brilliant green

- Brilliant green	0.1	กรัม
- น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ต้มจนเดือดเป็นเวลานาน 10 นาที (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ) เติมสารละลาย Iodine 20 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1% Brilliant green 10 มิลลิลิตร บรรจุหลอดแก้วขนาด 16 X 150 มิลลิลิตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร

6.10.1.17 Trypticase (Tryptic) Soy Broth (TSB)

ส่วนผสม

- Peptone from casein	17.0	กรัม
- Peptone soymeal	3.0	กรัม
- (+) Glucose	2.5	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- di-Potassium hydroden phosphate	2.5	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.3 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.3 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุขวดแก้วปริมาตร 225 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6.10.1.18 Triple Sugar Iron (TSI) Slant

ส่วนผสม

- Peptone from casein	15.0	กรัม
- Peptone from meat	5.0	กรัม
- Meat extract	3.0	กรัม
- Yeast extract	3.0	กรัม
- Lactose	10.0	กรัม
- Sucrose	10.0	กรัม
- Glucose	1.0	กรัม
- Ferrous sulfate	0.2	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- Sodium thiosulfate	0.3	กรัม
- Phenol red	0.024	กรัม

- Agar 15.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 7.4 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับ pH เป็น 7.4 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 X 100 มิลลิลิตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางหลอดในลักษณะอาหารเอียง

6.10.1.19 Urea Agar (Slant)

ส่วนผสม

- Peptone from meat 1.0 กรัม
- Lactose 1.0 กรัม
- Sodium chloride 5.0 กรัม
- Potassium dihydrogen phosphate 2.0 กรัม
- Phenol red 0.012 กรัม
- Urea 20.0 กรัม
- Agar 15.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 6.8 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้น agar ด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน

ละลาย agar ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผสมส่วนผสมทั้ง 2 ส่วน เข้าด้วยกัน บรรจุหลอดแก้วปราศจากเชื้อขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร วางหลอดในลักษณะอาหารเอียง

6.10.1.20. Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar

ส่วนผสม

- Yeast extract 3.0 กรัม
- Sodium chloride 5.0 กรัม
- D(+)xylose 3.75 กรัม
- Lactose 7.5 กรัม
- Sucrose 7.5 กรัม

- L(+) lysine	5.0	กรัม
- Sodium deoxycholate	1.0	กรัม
- Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
- Ammonium iron(III) citrate	0.8	กรัม
- Phenol red	0.08	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.4 ± 0.2

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.4 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ต้มจนเดือดเป็นเวลานาน 10 นาที (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ) เทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตร

10.2 วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหาร

วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารมี 3 ขั้นตอนดังนี้:

1. การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวชนิดไม่คัดเลือก (Pre-enrichment procedure)

ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ enrichment broth 225 มิลลิตร ชั่งตัวอย่างอาหารชนิดต่างๆ จะใช้ enrichment broth ที่ต่างกัน เช่น กลุ่มอาหารผักและผลไม้แช่แข็ง อาหารทะเล และเนื้อสัตว์ จะใช้ Lactose broth เป็น enrichment broth ผสมให้เข้ากันโดยใช้ blender หรือ stomacher นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 35 หรือ 37 องศาเซลเซียส

2. การเพาะแยกเชื้อบนอาหารแข็งชนิดคัดเลือก (Isolation produce)

2.1 นำตัวอย่างอาหารที่บ่มเพาะเชื้อแล้วในข้อ 1 ถ่ายลงในอาหาร selective enrichment media ดังนี้

2.1.1 อาหารสด อาหารที่มีการปนเปื้อนสูง และอาหารสัตว์ : ดูดตัวอย่างจากข้อ 1. มา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 10 มิลลิลิตร ของอาหาร Rappaport – Vassiliadis (RV) medium และดูด 1 มิลลิลิตร ของตัวอย่างข้อ 1 ใส่ลงใน 10 มิลลิลตร ของอาหาร TT broth

2.1.2 อาหารชนิดต่างๆ : ดูดตัวอย่างอาหารจากข้อ 1. มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 10 มิลลิลิตร ของอาหารลี้ยงเชื้อ Selenite Cystine (SC) Broth และดูดอีก 1 มิลลิลิตร ของตัวอย่างในข้อ 1. ใส่ลงอาหาร 10 มิลลิลิตร ของ TT broth

นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มเพาะเชื้อโดยแยกตามลักษณะของอาหารดังนี้ คือ อาหารที่มีการปนเปื้อน และ อาหารสัตว์ : อบเพาะเชื้อ RV medium ที่ 42 $\pm$ 0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบ่มเพาะเชื้อ TT broth ที่ 43 $\pm$ 0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 ใช้ลูปขนาด 3 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อจากหลอดทดสอบแต่ละหลอดลงบนอาหาร XLD และอาหาร HE หรือ อาหาร BS และอาหาร BPLS Agar การเลือกใช้ชนิดของอาหาร selective agar นี้ ควรใช้อย่างน้อย 2 ชนิดขึ้นไป ส่วนจากหลอดทดสอบ RV medium ใช้ลูป streak ลงบนอาหาร XLD และใช้ Auto pipette ดูดเชื้อจากหลอดทดสอบปริมาตร 20 µl หยดลงอาหาร MSRV agar โดยทำ 5 จุด ใน 1 จานเพาะเชื้อ ต่อ 1 ตัวอย่าง

2.3 นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.4 ตรวจลักษณะโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร XLD agar โคโลนี สีชมพู หรือดำ เป็นมัน อาจมีจุดดำตรงกลางโคโลนี หรือ ไม่มีก็ได้

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร HE agar โคโลนี สีน้ำเงินแกมเขียว หรือ น้ำเงิน มีจุดดำมันตรงกลางโคโลนี หรือ ไม่มีก็ได้ บางโคโลนีจะมีสีดำทั้งโคโลนี

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร BS agar โคโลนี สีน้ำตาล เทา หรือ ดำ บางโคโลนีจะมี metallic sheen รอบๆ อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีน้ำตาลแล้วจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อเวลาบ่มเพาะเชื้อนานขึ้น มีลักษณะที่เรียกว่า halo effect

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร BG agar โคโลนีมีรูปร่างกลมขนาดปานกลาง สีชมพูขาวทึบแสง อาหารรอบๆ อาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นสีแดง สำหรับเชื้อ *Salmonella* ที่ไม่ใช้น้ำตาลแลคโตสและซูโครส ส่วนเชื้อ Salmonella ที่ใช้น้ำตาลแลคโตส หรือ ซูโครส จะเป็นสีเขียว

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRSV medium ลักษณะของเชื้อ *Salmonella* ที่มีแฟลตเจลลาจะเคลื่อนที่ไปบนอาหารนี้ ทำให้เห็นลักษณะของเชื้อเคลื่อนที่ไปจากรอยเดิมที่จุดไว้

2.5 เลือกโคโลนีต้องสงสัยว่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* อย่างน้อย 2 โคโลนี หรือมากกว่า โดยพยายามเลือกโคโลนีที่อยู่เดี่ยวๆ ทำการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test) โดยถ่ายเชื้อลงในอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) และ Lysine Iron Agar (LIA) หรือ LIM โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแทง (Stab) และ Streak ลงบน TSI ก่อนแล้วจึงเขี่ยลงบนอาหาร LIA โดยไม่เผาเข็มเขี่ยเชื้อ คลายฝาเกลียวหลอดทดสอบที่ถ่ายเชื้อแล้วให้หลวมเพื่อให้สภาพภายในหลอดทดสอบเป็นสภาพที่มีอากาศเล็กน้อย ป้องกันการสร้างก๊าซ H_2S มากเกินไปจนดันอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นมาดันฝาจุกหลอด และ Streak บนอาหาร Urea agar

2.6 บ่มหลอดทดสอบอาหาร TSI , LIA และ Urea agar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดนี้เตรียมอยู่ในอาหารเอียง (slant) และ *Salmonella* ส่วนใหญ่จะให้ผลการทดสอบ ดังตาราง 6.1

ตาราง 6.1 การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อจำแนก *Salmonella*

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ	การเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเจริญของ *Salmonella*	การจำแนก	การบันทึกผล
Triple Sugar Iron Agar	-ส่วนเอียงมีสีแดง -ส่วนก้นมีสีเหลือง -วุ้นมีรอยแตก -มีสีดำ	-ไม่หมัก lactose และ sucrose -หมัก glucose -ผลิตก๊าซ -ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์	Alkaline (K) Slant Acid (A) butt Gas+ H_2S+
Lysine Iron Agar	-เปลี่ยนเป็นสีม่วง -มีสีดำ	-ผลิตไลซีนดีคาร์บอกซิเลส -ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์	LDC+ H_2S+
Urea Agar	-ไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง	-ไม่ผลิตยูรีเอส	-

ในกรณีที่การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นดังกล่าวแสดงผลของ *Salmonella* ควรทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าเป็น เชื้อ *Salmonella*

2.7 นำหลอดทดสอบที่ให้ผลต้องสงสัยว่าเป็น เชื้อ *Salmonella* ไปทำการทดสอบทางชีวเคมีและน้ำเหลืองวิทยา

3. Identification of *Salmonella*

3.1 ทำการแยกเชื้อที่ได้ให้บริสุทธิ์ โดยเขี่ยลงบนอาหาร XLD หรือ HE อีกครั้ง นำเชื้อไปทดสอบยืนยัน

3.2 ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

3.2.1 ทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ยูรีเอส (Urease test)

3.2.2 ทดสอบการเจริญในอาหาร Malonate broth

3.2.3 ทดสอบการเกิด indole

3.2.4 ทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยา (Serological test)

ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีและน้ำเหลืองวิทยา แสดงดังตารางที่ 6.2 และ**เกณฑ์สำหรับการตัดสินว่า**เชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบนั้นไม่ใช่เชื้อ *Salmonella* แสดงดังตาราง**ที่** 6.3

ตาราง 6.2 ปฏิกิริยาทางชีวเคมีและน้ำเหลืองวิทยาของ *Salmonella*

Test or substrate	Result		*Salmonella* species reaction(a)
	Positive	Negative	
Glucose (TSI)	yellow butt	red butt	+
Lysine decarboxylase (LIA)	purple butt	yellow butt	+
H_2S (TSI and LIA)	blackening	no blackening	+
Urease	purple-red color	no color change	–
Lysine decarboxylase broth	purple color	yellow color	+
Phenol red dulcitol broth	yellow color and/or gas	no gas; no color change	+[b]
KCN broth	growth	no growth	–
Malonate broth	blue color	no color change	–[c]
Indole test	violet color at surface	yellow color at surface	–
Polyvalent flagellar test	agglutination	no agglutination	+
Polyvalent somatic test	agglutination	no agglutination	+
Phenol red sucrose broth	yellow color and/or gas	no gas; no color change	–
Voges-Proskauer test	pink-to-red color	no color change	–
Methyl red test	diffuse red color	diffuse yellow color	+
Simmons citrate	growth; blue color		

[a] +: 90% or more positive in 1 or 2 days; –: 90% or more negative in 1 or 2 days; v: variable.

[b] Majority of *S. arizonae* cultures are negative.

[c] Majority of *S. arizonae* cultures are positive.

ที่มา : Andrews et. al, (2002)

ตาราง 6.3 เกณฑ์สำหรับการตัดสินว่าเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบนั้นไม่ใช่เชื้อ *Salmonella*

Test or substrate	Results
1. Urease	positive (purple-red color)
2. Indole test and	positive (violet color at surface)
Polyvalent flagellar (H) test;	negative (no agglutination)
or	
Indole test and	positive (violet color at surface)
Spicer-Edwards flagellar test	negative (no agglutination)
3. Lysine decarboxylase and	negative (yellow color)
KCN broth	positive (growth)
4. Phenol red lactose broth	positive (yellow color and/or gas)[a], [b]
5. Phenol red sucrose broth	positive (yellow color and/or gas)[b]
6. KCN broth,	positive (growth)
Voges-Proskauer test, and	positive (pink-to-red color)
Methyl red test	negative (diffuse yellow color)

[a] Test malonate broth positive cultures further to determine if they are *S. arizonae*.

[b] Do not discard positive broth cultures if corresponding LIA cultures give typical *Salmonella* reactions; test further to determine if they are *Salmonella* species.

ที่มา : Andrews et. al, (2002)

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* มีหลายวิธี ได้แก่ วิธี Standard Conventional Method แสดงดังภาพที่ 6.1 วิธี Modifidied Method แสดงดังภาพที่ 6.2 และวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ตามวิธี ISO 6579

การวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* โดยวิธี Standard Conventional Method วิธีการตรวจวิเคราะห์แสดงดังภาพ 6.1

ชั่งตัวอย่างอาหารจำนวน 25 กรัม
เติมอาหารเหลว Lactose Broth (LB), Trypticase Soy broth(TSB)
Nutrient Broth (NB) หรือ Buffered Peptone Water (BPW)
↓
นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 หรือ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง
↓
ถ่ายเชื้อจำนวน 1 มิลลิลิตร ลงใน 10 มล. ของ Tertrationate broth (TT)
และ 1 มิลลิลิตร ลงใน Selenite Cysine broth (SC)
↓
นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 หรือ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
↓
ถ่ายเชื้อที่บ่มแล้วโดยวิธี streak ด้วย loop ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
XLD, HE, BS หรือ BPLS (เลือกอย่างใดอย่างหนึ่งต้องไม่น้อยกว่า 2 ชนิด
ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
↓
นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 หรือ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
↓
เลือกโคโลนีที่มีลักษณะ typical ของเชื้อ *Salmonella* ใน
แต่ละชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ
ถ่ายลงในอาหาร TSI, LIA หรือ LIM และ Urea agar
↓
อ่านผล TSI, LIA หรือ LIM และ Urea agar
↓
ทดสอบทางชีวเคมีและน้ำเหลืองวิทยา

ภาพ 6.1 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* โดยวิธี Standard Conventional Method

การวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* โดยวิธี Modified Method วิธีการตรวจวิเคราะห์ แสดงดังภาพ 6.2

ชั่งตัวอย่างอาหารจำนวน 25 กรัม
เติมอาหารเหลว Lactose Broth (LB), Trypticase Soy broth(TSB)
Nutrient Broth (NB) หรือ Buffered Peptone Water (BPW)
↓
นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 หรือ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง
↓
ถ่ายเชื้อที่บ่มแล้ว จำนวน 0.1 มิลลิลิตร
ใส่ลงใน Rappaport Vassilia (RV) 10 มิลลิลิตร
↓
บ่มเพาะเชื้อที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
↓
ถ่ายเชื้อโดยใช้ Auto pipette ดูดเชื้อจาก RV broth culture
จำนวน 20 µl หยดลงบน MSRV โดยทำ 5 หยด ต่อ 1 ตัวอย่าง ใน 1 จานเพาะเชื้อ
↓
ถ่ายเชื้อจาก RV broth โดยวิธี streak ลงบนอาหาร
XLD ด้วย (เพื่อตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่เป็น non – motile)
↓
บ่มเพาะเชื้อที่ 42 องศาเซลเซียส สำหรับ MSRV
และที่ 35 หรือ 37 องศาเซลเซียสสำหรับ XLD นาน 24 ชั่วโมง
↓
ตรวจสอบการเกิด motility ของเชื้อรอบๆ จุดที่ inoculate ไว้บน
MSRV และตรวจดู typtical colony บน XLD
↓
เลือกเชื้อ *salmonella* ที่ให้ลักษณะ motile บนอาหาร MSRV
โดยพยามยามเขี่ยจากจุดที่เคลื่อนที่ออกไปจากจุดที่เริ่ม inoculate
ถ่ายลงใน TSI และ LIA หรือ LIM
↓
บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD เลือกโคโลนีเฉพาะของเชื้อ *Salmonella*
ถ่ายลงใน TSI และ LIA หรือ LIM เช่นเดียวกัน
↓
อ่านผล TSI, LIA หรือ LIM
↓
ทดสอบทางชีวเคมี และน้ำเหลืองวิทยา

ภาพ 6.2 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* โดยวิธี Modified Method

วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonella ตามวิธี ISO 6579

i) Non-selective pre-enrichment

ชั่งตัวอย่างหนัก 25 กรัม ใส่ใน stomacher bag เติม Buffered Peptone Water (BPW) 225 มิลลิลิตร เป็น pre-enrichment ตี ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher) นาน 2 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ± 2 ชั่วโมง

ii) Selective enrichment

ใช้ sterile pipet ดูดตัวอย่างอาหารจากข้อ i) ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Rappaport - Vassiliadis Broth (RVS broth) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24± 3 ชั่วโมง

iii) Selective plating

นำตัวอย่าง Rappaport-Vassiliadis Broth (RVS broth) จากข้อ ii) ที่บ่มครบกำหนดเวลามาปั่นให้เข้ากัน ด้วยเครื่องผสม (Vortex mixer) แล้วใช้ลูปถ่ายของเหลวปริมาณ 1 ลูป streak ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective media) 3 ชนิด คือ Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD), Hektoen Enteric Agar (HE) และ CHROMagar™ *Salmonella* บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* มีลักษณะ กลม ผิวนูนเรียบ สีแดงขอบใส เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร อาจมีจุดสีดำอยู่ตรงกลางโคโลนีหรือไม่มีก็ได้

Hektoen Enteric Agar (HE) โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* มีลักษณะ กลมผิวนูนเรียบ สีน้ำเงินขอบใสเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร อาจมีจุดสีดำอยู่ตรงกลางโคโลนีหรือไม่มีก็ได้

CHROMAgar™ *Salmonella* แยกโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* ให้ชัดเจนเป็นสีม่วงอมชมพู มีลักษณะกลม ผิวนูนเรียบ ขอบใส เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร อาจมีจุดสีดำอยู่ตรงกลางโคโลนี หรือไม่มีก็ได้

iv) Biochemical confirmation

ขั้นตอนการทดสอบทางชีวเคมีให้เลือกโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* ที่ให้ผลบวกกับอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ iii) มาทำการทดสอบดังต่อไปนี้

a) Triple sugar Iron Agar (TSI) ใช้ needle ปลายแหลม แตะเชื้อ *Salmonella* จากอาหารเลี้ยงเชื้อใน ข้อ iii) streak ลงบนผิว (slant) แล้วแทง needle ลงไปในเนื้อของ Triple Sugar Iron Agar จนถึงก้นหลอด (butt) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วนำมาอ่านผลดังนี้

Slant

ผลบวก(+) : สีของ TSI เปลี่ยนจากสีแดงส้ม เป็นสีเหลือง (acid หรือ A) แสดงว่ามีการใช้ Lactose และ / หรือ Sucrose

ผลลบ (-) : สีของ Triple Sugar Iron Agar เปลี่ยนจากสีแดงส้ม เป็นสีแดงเข้ม (alkaline หรือ K) หรือไม่เปลี่ยนสี (N) แสดงว่าไม่มีการใช้ Lactose และ / หรือ Sucrose

Butt

ผลบวก (+) : สีของ TSI เปลี่ยนจากสีแดงส้ม เป็นสีเหลือง แสดงว่ามีการ ferment glucose

ผลลบ (-) : สีของ TSI เปลี่ยนจากสีแดงส้ม เป็นสี แดงเข้ม หรือไม่เปลี่ยนสี แสดง ว่าไม่มีการ ferment glucose

H_2S

ผลบวก (+) : ก้นหลอดของ TSI เป็นสีดำ แสดงว่า มีการสร้าง H_2S และก้นหลอดมีรอยแยกแตก แสดงว่ามีการสร้างแก๊ส

ผลลบ (-) : ก้นหลอดของ TSI ไม่เป็นสีดำ แสดงว่า ไม่มีการสร้าง H_2S Gas และก้นหลอดไม่มีรอยแยกแตก แสดงว่าไม่มีการสร้างแก๊ส และไม่ใช้ Lactose

b) Lysine Indole Motility medium (LIM) แทง needle ที่ใช้ใน ข้อ a. ลงไปใน LIM ประมาณ 2 ใน 3 ของหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาอ่านผลดังนี้

Slant

ผลบวก (+) : สีของ LIM เป็นสีม่วงเข้มกว่าเดิมหรือไม่เปลี่ยนสีแสดงว่ามีการใช้ Lysine

ผลลบ (-) : สีของ LIM เปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าไม่มีการใช้ Lysine

Butt

ผลบวก (+) : สีของ LIM เป็นสีม่วงเข้มกว่าเดิมหรือไม่เปลี่ยนสี แสดงว่ามีการใช้ Lysine

ผลลบ (-) : สี ของ LIM เปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าไม่มีการใช้ Lysine

H_2S

ผลบวก (+) : ก้นหลอดของ LIM เป็นสีดำแสดงว่ามีการสร้าง H_2S

ผลลบ (-) : ก้นหลอดของ LIM ไม่เป็นสีดำแสดงว่าไม่มีการสร้าง H_2S

c) Indole Test หยดน้ำยา Kovac's 2-3 หยดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ LIM ในข้อ b) เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำมาอ่านผลดังนี้

ผลบวก (+) : เกิดวงแหวนสีแดงหรือชมพูระหว่างชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ LIM และน้ำยา Kovac's

ผลลบ (-) : เกิดวงแหวนสีน้ำตาล-เหลืองระหว่างชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ LIM และน้ำยา Kovac's

v) Serological confirmation

a) Negative Control Sample นำสไลด์ที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วหยด 0.85 % Normal saline solution 1 ลงบนสไลด์ แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Inoculating needle) เขี่ยเชื้อจาก TSI agar ที่แสดงผลบวกคู่ กับ LIM ลงไปสังเกตการณ์เกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มภายใน 30 - 60 วินาที หากเกิดตะกอนแสดงว่าเชื้อดังกล่าวไม่สามารถทดสอบซีโรไทป์ได้ เนื่องจากเชื้อ rough (หมายถึงเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีไม่เรียบ จะตกตะกอนกับ 0.85 % Normal saline solution และ antiserum ทุกชนิดทำให้ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเชื้อชนิดใด) ถ้าไม่ตกตะกอนใน 0.85 % Normal saline solution จึงนำไปทำการทดสอบต่อได้

b) การทดสอบเชื้อโดยใช้ Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum A-67 โดยนำสไลด์ที่ผ่าน การทำความสะอาดแล้วหยด antiserum A-67 ลงบนสไลด์ แล้วใช้ เข็มเขี่ยเชื้อ (Inoculating needle) เขี่ยเชื้อจาก TSI agar ที่ แสดงผลบวกคู่กับ LIM ลงไปสังเกตการตกตะกอน (agglutination) บนสไลด์

ผลบวก : เกิดการตกตะกอนภายใน 30-60 วินาที

ผลลบ : ไม่เกิดการตกตะกอน (ลักษณะขาวขุ่น) เหมือน Negative control sample

c) การทดสอบเชื้อโดยใช้ Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum A-I โดยนำสไลด์ที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วหยด antiserum A-I ลงบนสไลด์ แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Inoculating needle) เขี่ยเชื้อจาก TSI agar ที่ แสดงผลบวกคู่กับ LIM ลงไป สังเกตการตกตะกอน (agglutination) บนสไลด์

ผลบวก : เกิดการตกตะกอนภายใน 30-60 วินาที แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบนี้ อยู่ระหว่าง group A ถึง group I ให้ทำการทดสอบเชื้อเพื่อจำแนกตามรายละเอียดในข้อ d) ต่อไป

ผลลบ : ไม่เกิดการตกตะกอน (ลักษณะขาวขุ่น) เหมือน Negative control sample แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบนี้อยู่ระหว่าง O group J (O group 17)

ถึง O group 67 ให้สรุปว่าเชื้อที่ทำการทดสอบนี้จะอยู่ในระหว่างช่วง Salmonella group J ถึง Salmonella O:67

d) การทดสอบเชื้อเพื่อจำแนก group ด้วย Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum group A, B, C, D, E และ I โดยนำสไลด์ที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วหยด Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum group A, B, C, D, E และ I ลงบนสไลด์ (ทำทีละ group) แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Inoculating needle) เขี่ยเชื้อจาก TSI agar ที่แสดงผลบวกคู่กับ LIM ลงไปสังเกตการ ตกตะกอน (agglutination) บนสไลด์ โดยถ้าให้ผลบวกกับ O group ใดก็ได้ให้สรุปว่า เชื้อที่ทดสอบอยู่ group นั้น เช่น

ถ้าให้ผลบวกกับ Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum group A ก็แสดงว่าเชื้อที่เขี่ยมาจาก TSI agar นั้นเป็น Salmonella group A

e) การแปลผล

Negative (- , ไม่พบ) แสดงว่าให้ผลลบตั้งแต่ในขั้น Selective plating

Positive (+, พบ) แสดงว่าให้ผลบวกตั้งแต่ในขั้น Selective plating ไปจนถึงขั้น Biochemical confirmation และ Serological confirmation โดยจะต้องระบุ group ที่พบ

วิธี Rapid Test สำหรับตรวจหาเชื้อ *Salmonella*

Rapid Presumptive Test Method

วิธีวิเคราะห์แบบรวดเร็ว (rapid method) ในด้านจุลชีววิทยาทางอาหาร ที่ถูกระบุเป็น Official Method ไว้ใน AOAC (Association of Official Analytical Chemistry) นั้นได้ผ่านการศึกษาร่วมกันระหว่างห้องปฏิบัติการต่างๆ ซึ่งเรียกว่า Collaborative study โดยมีห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 8 แห่ง จะทำการศึกษาร่วมกัน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและลงความเห็นว่าวิธีนั้นมีความถูกต้องแม่นยำเพียงใด เป็นที่ยอมรับได้หรือไม่ในกรณี AOAC ยอมรับแล้ว US. FDA ก็จะระบุไว้ในคู่มือการวิเคราะห์ BAM (Bacteriological Analytical Manual)

Rapid Test ที่ถูกระบุเป็น Official Method ใน AOAC นั้นเป็น Screen Test หรือ Presumptive Test เท่านั้น โดยที่ตัวอย่างที่ให้ผลลบนั้นเชื่อถือได้ ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลบวกนั้นจะต้องมีการตรวจยืนยัน (Confirmation Test) โดยวิธี Conventional ทุกครั้งไป

ข้อเสียของ Rapid Test คือ มีราคาสูง และมีหลายวิธีที่ใช้ได้ในบางเงื่อนไขเท่านั้น นอกนั้นจะต้องมีการ Enrichment ก่อนนำไปตรวจสอบโดยวิธี Rapid Test ได้

วิธี Rapid Test สำหรับตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่ระบุใน AOAC

1. Fluorescent Antibody (FA) for *Salmonella* Screening Test

   วิธีนี้ระบุไว้เป็นวิธี Screen Test ไม่ใช่ Confirmation Test เนื่องจาก Conjugate สามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่ม Enterobacteriaceae อื่นๆ ด้วย ดังนั้น Enrichment Broth ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี FA Techniqe จะต้องนำมา Streak บน Selective Media (HE, XLD และ BSA) และนำ typical colonies ไปตรวจสอบยืนยันโดยวิธี Conventional Method

2. Colorimetric Monoclonal Enzyme Immunoassay for *Salmonella* Screening Test

3. Colorimertric Polyclonal Enzyme Immonoassy for *Salmonella* Screening Test

   วิธีการตามข้อ 2. และข้อ 3. ได้ระบุไว้เนื่องจากพบว่า Monoclonal และ Polyclonol antibodies ที่ใช้ในการตรวจสอบสามารถให้ผล cross reaction กับ non-salmonella ได้ด้วย ดังนั้น Enrichment broth ของตัวอย่างที่ให้ผลบวก Enzyme immunoassay (EIA) จะต้องนำไป Streak บน Selective Agar (HEA, XLD และ BSA) และนำ typical colonies ไปตรวจสอบยืนยันโดยวิธี Conventional Method

4. DNA Hybridization for *Salmonella* Screening Test

วิธีนี้ใช้วิเคราะห์หา *Salmonella* ในอาหารทุกชนิด แต่เนื่องจากให้ผล false positive ด้วย ดังนั้นตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมดต้อง confirm ด้วยวิธี Conventional Method ของตัวอย่างที่ให้ผลบวก Streak ลงบน Selective Agar ((HEA, XLD และ BSA) และนำ typical colonies ตรวจสอบยืนยันต่อไป

5. Hydrophobic membrane Filter for *Salmonella* Screening Test

วิธีนี้ใช้วิเคราะห์หา *Salmonella* ในอาหารประเภทต่างๆ เช่น ขอคโกเลต,เนื้อสัตว์และสัตว์ปีก, ไข่ผง, pectin และ nonfat milk วิธีนี้ใช้ membrane filter ซึ่งแบ่ง surface ของ membrane ออกเป็นส่วนๆ ในขนาดที่เท่ากัน โดยใช้ hydrophobic material barrier หรือ line กั้นเป็น grid pattern วิธีนี้ระบุให้ต้อง confirm ด้วยวิธี Conventional Method

6. Motile *Salmonella* in food Immunodiffusion for *Salmonella* Screening Test

วิธีนี้ไม่ใช่เป็นวิธี Confirmation Test เพราะใช้หลักการของ polyvalent H (flagella) antibodies และในการทดสอบ นี้สามารถเกิด crosse reation กับ non-salmonella ได้ ที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือวิธีนี้ไม่สามารถตรวจสอบ เชื้อ non- motile salmonella ได้ ดังนั้นตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะต้องนำไป streak บน Selective agar และนำ typical colonies ไปตรวจสอบยืนยันโดยวิธี Conventional Method (มาลัย, 2541)

ตารางที่ 6.4 เป็นการแสดงวิธี rapid method ของการหาเชื้อ *Salmonella* ที่ได้รับการรับรอง โดย AOAC

ตาราง 6.4 AOAC-RI Performance Test Methods for Detection of *Salmonella* in Food and Related Products

Test kit	Manufacturer	Matrixes
Path-Stik	Lumac B.V.	food
Reveal	Neogen	food
Bioline ELISA	Bioline	food, feed
Salmonella Screen/ *Salmonella* Verify	Vicam L.P.	food, feed Stainless steel, concrete
Oxoid Rapid Test for *Salmonella*	Oxoid Ltd.	Food, feed environmental samples
Salmonella DLP Assay	GENE-TRAK Systems Corp.	food, feed environmental samples
Dynabeads anti- *Salmonella* Kit	Dynal S.A.	food, feed
BIND *Salmonella* Rapid Assay kit	IDEXX Laboratories, Inc.	food, feed
Bax for Screening *Salmonella*	Qualicon	Milk, chicken, Turkey, beef, and pork
TECRA Unique	TECRA Diagnostics	Food and environmental samples

ที่มา : Downes, F. P. and ITO, K. (2001)

บทปฏิบัติการที่ 7
การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในอาหาร

7.1 ความมุ่งหมาย(Purpose)

เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในอาหาร

7.2. การใช้งาน (Application)

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ในอาหาร

7.3 เอกสารอ้างอิง (References)

7.3.1 สร้อยทอง สายหยุดทอง. (ผู้บรรยาย). (16-17 กุมภาพันธ์ 2541). เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร" สำหรับบุคลากรบริษัทวันไทยอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด. หน้า 51 - 62. กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

7.3.2 ศิริโฉม ทุ่งเก้า. (2543). ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา. 158 หน้า.

7.3.3 AOAC. (1995). Officical Methods of Analyses of Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Associations of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.

7.3.4 Difco Laboratories. (2009). Difco & BBL Manual of Microbiological Culture Media and Reagents. 2nd ed., Sparks, Maryland 211152 USA.

7.3.5 Downes, F. P. and ITO, K. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington. DC. 676 p.

7.3.6 ICMSF. (1998). Microorganisms in Foods. Blackie Academic and Profession, London.

7.3.7 Merck company. (2002). Merck Microbiological Manual. KGaA, Darmstadt, Germany. From : www. http://service.merck.de/microbiology/

7.3.8 U .S. Food and Drug Administration. (1995). Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

7.4 นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

7.4.1	BPA	=	Baird-Parker agar
7.4.2	BHI	=	Brain Heart Infusion Broth
7.4.3	TSA	=	Trypticase Soy Broth with 10% sodium chloride
7.4.5	MSA	=	Mannitol Salt Phenol - red Agar
7.4.6	MPN	=	Most Probable Number

7.5 หลักการทางวิทยาศาสตร์ (Principle)

S. aureus เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก รูปร่างกลมจับกันเป็นพวงองุ่น มีโคโลนีสีเหลืองทอง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6.67 – 45.5 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะกับการเจริญเติบโตที่สุดคือ 35 องศาเซลเซียส เป็นพวก Facultative anaerobe คือ เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศและมีอากาศเพียงเล็กน้อย ในสภาวะที่มีอากาศค่า a_w (Water activity) ต่ำสุดที่จะเจริญได้คือ 0.86 ค่า pH ต่ำสุดเท่ากับ 4.8 ส่วนในสภาวะที่ไม่มีอากาศค่า a_w ต่ำสุดเท่ากับ 9.0 ค่า pH ต่ำสุดจะอยู่ที่ 5.5 ค่า pH สูงสุดที่จะเจริญได้คือ 8.0 ทนเกลือ ได้ถึง 10 - 15 % และทนน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 50 - 60 % นอกจากนี้ยังทนต่อสารพวกไนไตรท์ ได้ดีด้วย *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อนได้ต่ำ การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส นาน 12 นาที หรือ ใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 80 นาที สามารถทำลายเชื้อได้หมด หรือการใช้รังสีแกมมา 0.37 – 0.48 เมกกะเรด สามารถทำลาย *S. aureus* ได้หมด *S. aureus* สามารถสร้างเอนไซม์ coagulase ซึ่งทำให้ blood plasma ของคนและสัตว์แข็งตัว เราจึงเรียกเชื้อนี้ว่า Staphylococcus coagulase positive

แหล่งที่พบ *S.aureus*

อาหารที่มีการปนเปื้อนด้วยเชื้อโรคนี้มีหลายชนิด ได้แก่ อาหารพวกเนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (แฮม ฮอทดอก) สลัด อาหารพวกนม เนย คัสตาร์ด ขนมสอดไส้ชนิดต่างๆ คนและสัตว์จัดเป็นแหล่งของเชื้อที่ปนเปื้อนมาสู่อาหาร โดยเชื้ออาศัยอยู่ในรูจมูกและพบตามผิวหนัง แผล ฝีต่างๆ ถ้ามีการพบ *S. aureus* ในอาหารประเภทผ่านการแปรรูป จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขลักษณะของอาหารว่ามีการปนเปื้อนขึ้นภายหลังโดยอาจจะมาจากตัวผู้ประกอบอาหาร หรือระหว่างการเก็บ การขนส่ง ในอาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ การปนเปื้อนจะพบสารพิษ (Enterotoxin) มากกว่าตัวเซลล์ของแบคทีเรีย ถ้าตรวจพบตัวเซลล์แสดงว่าอาหารกระป๋องนั้นรั่วหรือการใช้ความร้อนไม่เพียงพอ อาหารกระป๋องจะแสดงอาการเสียให้เห็น

สารพิษ Enterotoxin

Enterotoxin ที่ผลิตโดย *S. aureus* เป็นสารประเภทโปรตีน มี 5 ชนิด คือ A B C D และ E สารพิษชนิด A และ D เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษมากกว่าชนิดอื่น สารพิษของ *S. aureus* สามารถละลายได้ดีในน้ำและสารละลายเกลือ ทนต่อความร้อนได้สูง สามารถทนต่อความร้อน 100 องศาเซลเซียส ได้นานมากกว่า 30 นาที การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 10 นาที สามารถลดความรุนแรงของ toxin B ได้แต่ไม่สามารถทำลายได้หมด

สารพิษจะถูกสร้างขึ้นเมื่ออาหารนั้นมีจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียหลายล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือต่อกรัมอาหาร ถูกสร้างได้ที่อุณหภูมิ 15.6 – 46.1 องศาเซลเซียส แต่สร้างได้ดีในช่วง 21 -36 องศาเซลเซียส มักสร้างเมื่อจุลินทรีย์อื่นถูกทำลายไปหมดแล้ว เช่น อาหารที่ผ่านความร้อนแล้วถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อโรคนี้ในภายหลัง (สร้อยทอง, 2541)

การเกิดโรค

เมื่อรับประทานอาหารที่มีสารพิษเข้าไป จะทำให้เกิดอาการของโรคทางเดินอาหารอย่างเฉียบพลัน ภายใน 1 - 6 ชั่วโมง ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับความต้านทานโรคของผู้ป่วยและปริมาณ สารพิษที่บริโภคเข้าไป มีอาการมึนงง คลื่นไส้ อาเจียน เป็นตะคริวที่ท้อง ท้องเดิน มีไข้ อาการจะหายเองภายใน 24 - 72 ชั่วโมง อัตราการตายพบได้น้อย

7.6 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

ตาราง Most Probable Number (MPN)

7.7 ความปลอดภัย (Safety)

7.7.1 ต้องสวมเสื้อคลุมตลอดระยะเวลาปฏิบัติการเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ติดผิวหนังหรือเสื้อผ้า รวมทั้งป้องกันตัวเองและเสื้อผ้าจากการกระเด็นของสารเคมีและสิ่งสกปรกต่างๆ

7.7.2 ห้ามรับประทานอาหาร ดื่มหรือสูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนห้ามเคี้ยว หรือกัดดินสอ ปากกา

7.7.3 หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับหน้าหรือตาระหว่างปฏิบัติงาน

7.7.4 ก่อนและหลังปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อความสะอาดบริเวณปฏิบัติงานทุกครั้ง

7.7.5 ต้องติดฉลาก แสดง ชื่อ วันที่ ตัวอย่าง ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อหรืออื่นๆ ลงบน จานเพาะเชื้อ หรืออุปกรณ์ทดลองเพื่อป้องกันการล้างหรือนำไปทิ้งโดยไม่ตั้งใจ

7.7.6 ใช้ตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์ด้วยความระมัดระวัง ห้ามวางตะเกียงดังกล่าวไว้ใกล้ภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์หรือสารไวไฟต่างๆ รวมทั้งระมัดระวังมือและเส้นผม หรือส่วนต่างๆ ของร่างกายจากการถูกไฟลวก ดับตะเกียงทุกครั้งเมื่อเลิกใช้งาน

7.7.7 วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม จานเพาะเชื้อหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปล้าง

7.7.8 สไลด์ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปกำจัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

7.7.9 ก่อนและหลังปฏิบัติการทุกครั้งต้องล้างมือด้วยสบู่ และเช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์) ทุกครั้ง

7.8 เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipments and supplies)

7.8.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณภูมิ 35 องศาเซลเซียส

7.8.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

7.8.3 เครื่องวัด pH (pH meter)

7.8.4 เครื่องชั่ง (Balance)

7.8.5 เครื่องแก้ว ได้แก่ Petri dishes, Pipette, Dilution bottle, Glass rod spreader

7.8.6 รางแช่ปิเปต

7.8.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

7.8.8 กรรไกรปลอดเชื้อ

7.8.9 เครื่องตีป่นอาหาร (Stomacher)

7.8.10 ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (Stomacher bag)

7.8.11 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

7.9 สารมาตรฐาน (Standard)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

7.9.1 Baird-Parker Agar (BPA)

7.9.2 Brain Heart Infusion Broth (BHI)

7.9.3 Coagulase plasma (rabbit) with EDTA

7.9.4 Hydrogen peroxide 3%

7.9.5 Latex agglutination test Kit (Staphylococcus plus ของบริษัท Oxoid)

7.9.6 Mannitol Salt Phenol - red Agar (MSA)

7.9.7 Nutrient Agar (NA)

7.9.8 Phenol Red Broth

7.9.9 Trypticase Soy Broth with 10% sodium chloride (TSA)

7.10 วิธีดำเนินการ (Procedures)

7.10.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

7.10.1.1 Baird-Parker Agar

ส่วนผสม

- Peptone from casein	10.0	กรัม
- Meat extract	5.0	กรัม
- Yeast extract	1.0	กรัม
- Sodium sulphadimidine (0.2%)	25.0	มิลลิลิตร
- Lithium chloride	5.0	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	0.95	ลิตร

pH 7.4 + 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 950 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ

เตรียมสารละลาย sodium sulphadimidine เข้มข้น 0.2% โดยละลาย sodium sulphadimidine (sulphamezathine) ใน 0.1 N sodium hydroxide 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร

ส่วนผสมเพิ่มเติม

ก. Glycine 20%

วิธีเตรียม ชั่ง Glycine 20.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน

ข. 1% Potassium tellurite

วิธีเตรียม ชั่ง potassium tellurite 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน

ค. Egg-yolk tellurite enrichment

วิธีเตรียม แช่ไข่ไก่ในเอทานอลเข้มข้น 70% นาน 1 ชั่วโมง แยกไข่แดงออกจากไข่ขาวโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ผสมไข่แดง 3 ส่วนกับน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% (normal saline) 7 ส่วน ปั่นที่ความเร็วสูงเป็นเวลา 5 วินาทีด้วย blender ผสมไข่แดงที่ปั่นแล้ว 50 มิลลิลิตร กับ 1% potassium tellurite 10 มิลลิลิตร (จากข้อ ข.) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อครบสูตร

เติมส่วนผสม (ก.)Glycine 20% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และส่วนผสม (ค.)Egg-yolk tellurite enrichment ปริมาตร 50 มิลลิตร ลงในส่วนผสมพื้นฐาน (อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 950 มิลลิลิตร

7.10.1.2 Brain Heart Infusion Broth(BHI)

ส่วนผสม

- Nutrient substrate (extracts of brain and heart,and peptone)	27.5	กรัม
- D(+)Glucose	2.0	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- di-Sodium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.4 + 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.4 แบ่งใส่หลอดๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

7.10.1.3 Mannitol Salt Phenol - red Agar

ส่วนผสม

- Peptone	10.0	กรัม
- Meat extract	1.0	กรัม
- Sodium chloride	75.0	กรัม
- D(-) mannitol	10.0	กรัม
- Phenol red	0.025	กรัม
- Agar	12.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.4 $\pm$ 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับ pH เป็น 7.4 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อ

7.10.1.4 NA (Nutrient agar)

ส่วนผสม

- Peptone from meat	5.0	กรัม
- Meat extract	3.0	กรัม
- Agar	12.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.4 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับ pH เป็น 7.4 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7.10.1.5 Phenol red broth

ส่วนผสม

- Peptone from meat	10.0	กรัม
- NaCl	5.0	กรัม
- Phenol red	0.025	กรัม
- น้ำกลั่น	900.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นี่แบ่งใส่หลอดๆ ละ 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7.10.1.6 Trypticase soy broth with 10% sodium chloride

ส่วนผสม

- Tryptone หรือ trypticase	17.0	กรัม
- Soya peptone หรือ phytone	3.0	กรัม
- Dipotassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- D-Glucose	2.5	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0 + 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.2 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

7.10.2 การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus*

การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในอาหารหรือวัสดุอื่นที่ใช้ประกอบอาหาร ถ้ามีเชื้อก็แสดงถึงคุณภาพการสุขาภิบาลของอาหารนั้นไม่ดี (poor quality of food sanitation) มักมีการปนเปื้อนหลังการประกอบอาหาร ซึ่งเกิดได้จากการสัมผัส การไอ หรือจาม ของผู้ประกอบอาหาร หรือปนเปื้อนมาในขั้นตอนการเก็บรักษาและการขนส่งอาหาร ถ้าพบ *S. aureus* จำนวนมากๆ ในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูป (processed food) อาจบ่งบอกถึงการใช้ความร้อนไม่เพียงพอในกระบวนการฆ่าเชื้อด้วย อย่างไรก็ตาม การสรุปว่าอาหารเป็นพิษเกิดจากเชื้อดังกล่าวนี้ จะต้องตรวจสารพิษของเชื้อในอาหาร หรือพิสูจน์ได้ว่า เชื้อที่แยกได้จากอาหารนั้นผลิตสารพิษ

การตรวจหาเชื้อ *S. aureus* มี 2 วิธีคือ Direct Plate Count Method ดังภาพ 7.1 และวิธี Most Probable Number method ดังภาพ 7.5

7.10.2.1 Direct Plate Count Method

เป็นวิธีตรวจนับจำนวนเชื้อในอาหาร เหมาะสำหรับอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนมากกว่า > 100 CFU/g ได้แก่ อาหารสด อาหารที่ไม่ได้ผ่านความร้อนสูงหรืออาหารที่มีการปนเปื้อนสูง การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* โดยวิธี Direct Plate Count Method แสดงดังภาพ 7.1

วิธีการตรวจวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัมลงใน 0.1 % peptone water 225 มิลลิลิตร

↓

เจือจางต่อให้ได้ 1: 10, 1:100, 1:1000

↓

ปิเปต 1 มิลลิลิตร ของทุก dilution ลงใน Baird Parker Agar 3 จาน (0.4, 0.3, และ 0.3 มิลลิลิตร)

↓

เกลี่ยให้กระจายทั่วจานเพาะเชื้อ ด้วยแท่งแก้วโค้งงอ

↓

ปิดฝาจานเพาะเชื้อและวางหงายไว้ให้หน้าจานแห้ง ประมาณ 10 นาที

↓

คว่ำจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, 45-48 ชั่วโมง

↓

เลือกจานเพาะเชื้อที่มีลักษณะเฉพาะของโคโลนี *S. aureus* จำนวน 25 -250 โคโลนีมานับ

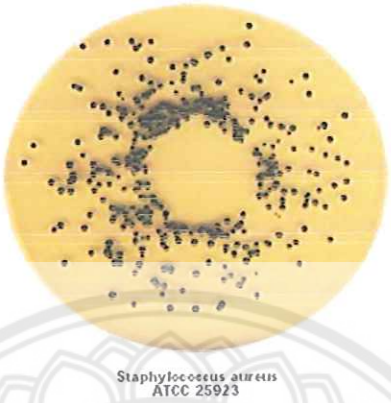
↓

เลือกโคโลนี *S. aureus* 1 โคโลนี หรือ มากกว่ามาทดสอบ Coagulase test

ภาพ 7.1 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* โดยวิธี Direct Plate Count Method

ลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

ลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* บน Baird Parker agar คือ โคโลนี กลม ผิวเรียบ โค้งนูน ชุ่มไม่แห้งขนาด 2 - 3 มม. สีเทาจนถึงดำ และมักมีขอบสีจางๆ ออกขาว ล้อมรอบด้วยบริเวณทึบตามด้วยขอบใสรอบโคโลนี ดังภาพ 7.2



ภาพ 7.2 ลักษณะโคโลนี *S. aureus* บนจานอาหาร Baird-Parker egg-yolk tellurite agar

ที่มา: Mecrk Microbiology Manual. (2002)

หมายเหตุ ตัวอย่างอาหารที่ผ่านความร้อนในการฆ่าเชื้อมาแล้ว หรือตัวอย่างที่มีโอกาสการปนเปื้อน *S. aureus* น้อย ให้ใช้ Mannitol Salt Agar + 3% egg yolk แทน Baird Parker Agar จะให้โคโลนีเฉพาะของ *S. aureus* สีเหลือง มีวงโดยรอบสีขาวขุ่น ดังภาพ 7.3

ภาพ 7.3 ลักษณะโคโลนี *S. aureus* บนจานอาหาร Mannitol Salt Phenol Red Agar

ที่มา: Mecrk Microbiology Manual. (2002)

การทดสอบ Coagulase test

- ใช้ loop แตะโคโลนี *S. aureus* ใส่ลงในหลอดที่มี BHI broth อยู่ 0.2 – 0.3 มิลลิลิตร
- บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง
- เติม Coagulase plasma ลงไป 0.5 มิลลิลิตร เขย่ากัน
- บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสนาน 6 ชั่วโมง ตรวจดูการแข็งตัวของ พลาสมา(clotting)
- ถ้าพลาสมายังไม่แข็งตัวให้บ่มต่อไปแล้วดูผลภายใน 48 ชั่วโมง หลังจากนี้แล้วให้ตัดทิ้งได้

รายงานผล Coagulase positive (เฉพาะ 3+ และ 4+ ส่วน 1+ และ 2+ ไม่ถือว่า positive)

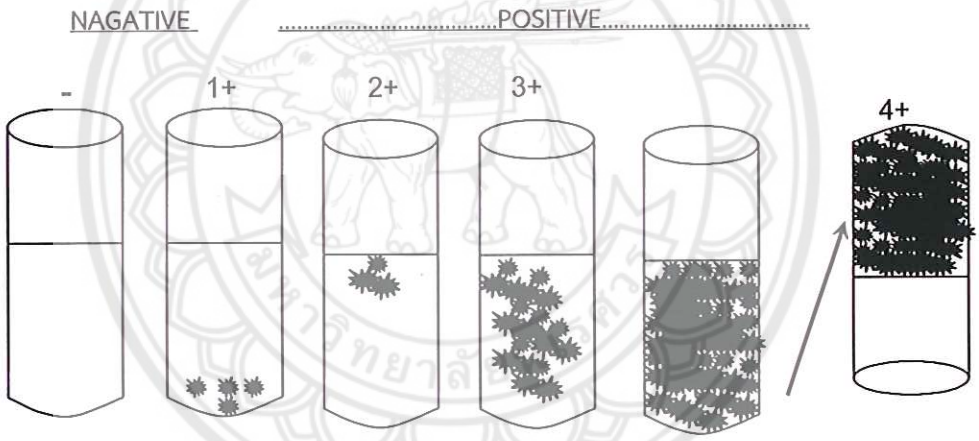
ลักษณะการแข็งตัวของพลาสมา มี 4 แบบ (1+, 2+ ,3+, 4+) ดังภาพ 7.4

1+ พลาสมาเริ่มแข็งตัวแต่ยังไม่เป็นก้อน

2+ พลาสมาแข็งตัวเป็นก้อนขนาดเล็ก

3+ พลาสมาแข็งตัวเป็นก้อนขนาดใหญ่ แต่ยังมีบางส่วนที่ไม่แข็งตัวเหลืออยู่

4+ พลาสมาแข็งตัวทั้งหมด เมื่อคว่ำหลอดก็ยังเกาะก้นหลอดอยู่เหมือนเดิม



ภาพ 7.4 ปริมาณการจับตัวของพลาสมาในการทดสอบโคแอกูเลส

ควรมีการทดสอบ *S. aureus* ยืนยันเพิ่มเติมโดยใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมี เพื่อใช้ระบุสายพันธุ์ *S. aureus* โดยดูจากตาราง 7.1

ตาราง 7.1 ปฏิกิริยาทางชีวเคมีเพื่อแยกเชื้อ *S.aureus*

	S. aureus	*S. epidermidis*	*Micrococcus* sp.
Catalase test	+	+	+
Coagulase test	+	-	-
Anaorobic utilization of			
-glucose	+	+	-
-manitol	+	-	-

การทดสอบ *S. aureus* ยืนยันเพิ่มเติม

- ย้อม Gram stain ได้แกรมบวกรูปร่างกลมอยู่กันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น
- Catalase test ให้ผลบวก
- Anaerobic utilization of glucose ให้ผลบวก

วิธีการทดสอบ

Catalase test

เพาะเชื้อบน Nutrient agar slant ที่ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วป้ายเชื้อบนสไลด์หยด 3% hydrogen peroxide ลงบนเชื้อ

ผลบวก : มีฟองอากาศเกิดขึ้น

Anaerbic utilization of glucose

เพาะเชื้อใน phenol red broth ที่มีน้ำตาลผสมอยู่แล้วปิดทับผิวหน้าอาหารนั้นด้วยพาราฟินเหลวหนาประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ดูการสร้างกรด

ผลบวก : สีอาหารเลี้ยงเชื้อ เปลี่ยนจากแดงเป็นเหลือง

Anaerobic utilization of manitol

Anaerobic utilization of manitol ปลูกเชื้อโดยแทง (stab) ตรงลงในอาหารวุ้น Mannitol 2 หลอด เทพาราฟินเหลวไร้เชื้อสูง 1 เซนติเมตร ปิดทับหลอดที่ 1 หลอด ส่วนอีก 1 หลอด ไม่ต้องเทพาราฟินเหลวทับ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ดูการสร้างกรด

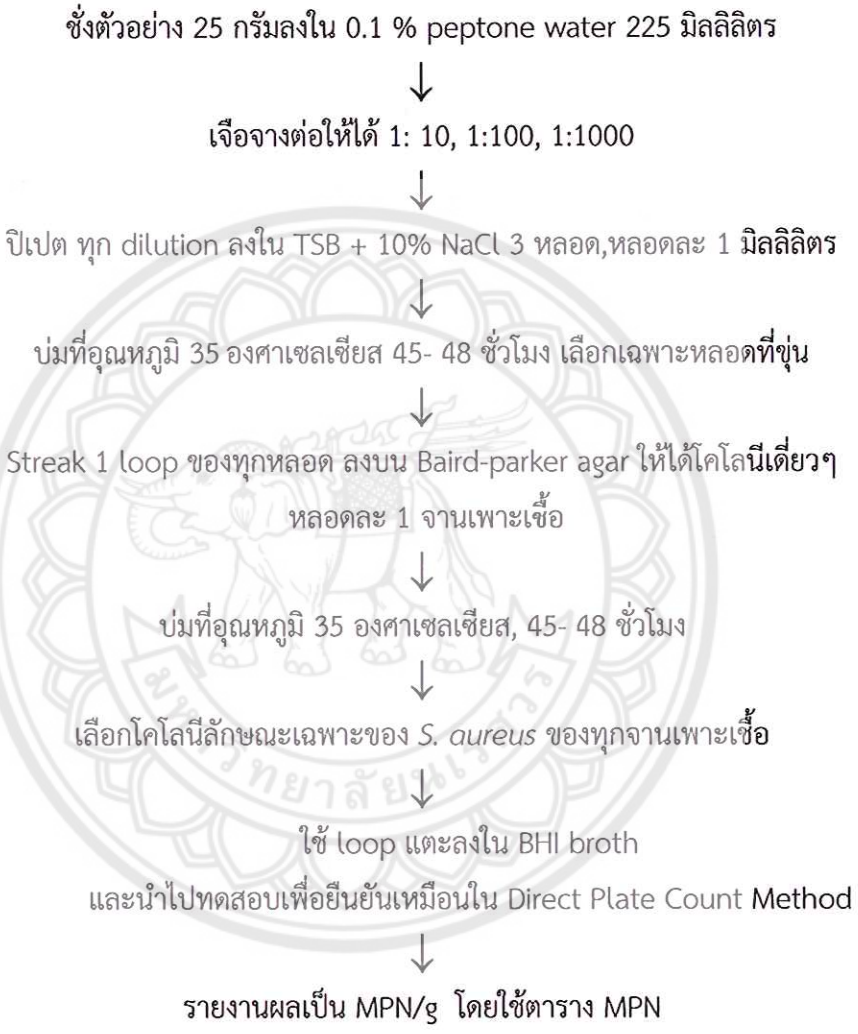
ผลบวก : สีอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากน้ำเงินเป็นเหลือง

การรายงานผล

นับจำนวนโคโลนี *S. aureus* ทั้งหมดในหนึ่ง dilution (รวม 3 จานเพาะเชื้อ) คูณด้วย dilution factor รายงานเป็น CFU/g

7.10.2.2 วิธี Most Probable Number method (MPN)

วิธีนี้เหมาะสำหรับใช้ตรวจประเมินคุณภาพอาหารเป็นประจำ ในกรณีที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อน้อย (< 100 CFU/g) ได้แก่ อาหาร ประเภท processed food, frozen foods และอาหารขอขึ้นทะเบียนตำรับอาหาร อย. วิธีการตรวจ *S. aureus* ด้วยวิธี Most Probable Number method โดยย่อแสดงดังภาพ 7.5



ภาพ 7.5 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* โดยวิธีเอ็มพีเอ็น

บทปฏิบัติการที่ 8
การตรวจวิเคราะห์ *Clostridium perfringens* ในอาหาร

8.1 ความมุ่งหมาย (Purpose)

เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์ *Clostridium perfringens* ในอาหาร

8.2 การใช้งาน (Application)

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์ *Clostridium perfringens* ในอาหาร

8.3 เอกสารอ้างอิง (References)

8.3.1 ธีรพร กงบังเกิด. **การตรวจวิเคราะห์ *Clostridium perfringens* ในอาหาร.** เอกสารประกอบการสอน ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตร**ศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติ** และสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยนเรศวร. 2 หน้า.

8.3.2 สร้อยทอง สายหยุดทอง. (2541). **การปนเปื้อนและการตรวจวินิจฉัย *Clostridium perfringens* ในอาหาร.** เอกสารของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 63 – 70.

8.3.3 AOAC. (1995). **Official Methods of Analyses of Association of Official Analytical Chemists.** 16th ed. Associations of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.

8.3.4 Downes, F. P. and ITO, K. (2001). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 4th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

8.3.5 ICMSF. (1998). **Microorganisms in Foods.** Blackie Academic and Profession, London.

8.3.6 Rhodehamel, E.J. and Harmon, S.M. (2001). ***Clostridium perfringens.*** **Bacteriological Analytical Manual** (BAM) [online]. สืบค้นจาก : http://www.fda.gov/Food/ Science Research/Laboratory Methods /Bacteriological Analytical Manual BAM/ ucm070878. htm เมื่อวันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2556.

8.3.7 Sacks, L.E. and Thompson, P.A. (1978). "Clear, Defined Medium for the Sporulation of *Clostridium perfringens.*" **Journal Applied and Environmental Microbiology.** Vol.35. pp. 405-410.

8.3.8 Zimbro M.J. and Power D.A. (2003). **Difco & BBL Manual of Microbiological Culture Media.** Maryland USA.

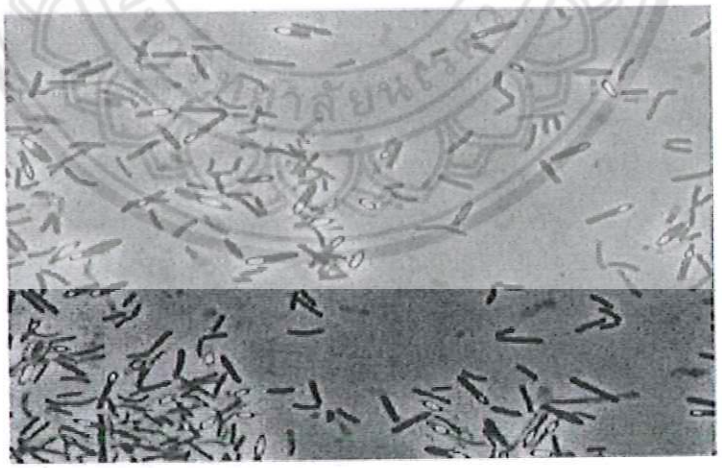
8.4 นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

4.1 TSC= Tryptose Sulphite egg-yolk Cycloserine Agar

8.5 หลักการทางวิทยาศาสตร์ (Principle)

รูปร่างลักษณะทั่วไป

C. perfringens เป็นแบคทีเรียรูปท่อนปลายตัด (blunt ends) ไม่เคลื่อนที่ มีขนาด 8.0 – 1.5 ไมครอน ยาว 2 – 4 ไมครอน เซลล์ที่เริ่มเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่จะมีรูปร่างสั้นหรือกลมในขณะที่เซลล์ที่บ่มทิ้งไว้นานจะมีรูปร่างยาวกว่าและอาจต่อกันเป็นสายเซลล์ของ *C. perfringens* ส่วนใหญ่มีแคปซูลหุ้มเซลล์เป็น polysaccharides ซึ่งชนิดของ polysaccharides ที่เป็นแคปซูลจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ และที่ผนังเซลล์จะพบน้ำตาล galactose, glucose และ rhamnose แตกต่างกันตามสายพันธุ์ (strain) และชนิด (type) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปสามารถสร้างแคปซูลได้แต่ไม่สร้างสปอร์ ถ้าสร้างสปอร์จะอยู่ค่อนข้างไปทางปลายเซลล์ (subterminal) โดยสปอร์จะทนต่อสารต้านการติดเชื้อทุกชนิด ยกเว้น formaldehyde และ glutaraldehyde แต่ vegetative cell มีความไวต่อความร้อนและสารต้านการติดเชื้อ ได้แก่ penicillin, erythromycin, cephalosporins, metronidazole, clindamycin แต่ดื้อยากลุ่ม aminoglycosides นอกจากนี้ *C. perfringens* ยังสร้างสปอร์และเจริญได้ในที่ไม่มีอากาศ ไม่สามารถเคลื่อนที่ แต่สร้างแคปซูลและย่อยสลายเจลาติน และหมักน้ำตาลแลกโตสทำให้เกิดแก๊ส สำหรับลักษณะของเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* แสดง ภาพ 8.1



ภาพ 8.1 เซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens*
ที่มา : Sacks และ Tompson. (1978)

C. perfringens เจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 20 – 50 องศาเซลเซียส และที่ pH ในช่วง 5.5 - 8.0 สภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารพิษ (enterotoxin) คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่

pH ในช่วง 6.5 – 7.3 *C. perfringens* มี 5 ชนิด คือ A B C D และ E โดย ชนิด A ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) โดยจะปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ อาหารที่พบเชื้อนี้ส่วนใหญ่ได้แก่ อาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่ทำให้สุกหรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก ในการทำให้อาหารสุกนั้น สปอร์ที่ทนต่อความร้อนจะรอดชีวิต ปริมาณเชื้อในอาหารที่ทำเกิดอาการเจ็บป่วยนั้น อาจมีถึง 10^6- 10^8 เซลล์ต่อกรัม สารพิษจะสร้างขึ้นจากเซลล์ที่กำลังสร้างสปอร์ แต่จะไม่ทนต่อความร้อน (heat labile) อาการที่เกิดขึ้นพบว่าจะทำให้ท้องเสีย (diarrhea) เป็นตะคริวที่ท้อง ท้องเดินอย่างแรง มักไม่พบอาการคลื่นไส้หรืออาเจียน ระยะฟักตัวของโรค 8 – 24 ชั่วโมง อาการของโรคจะหายเองภายใน 12 - 24 ชั่วโมง อัตราการตายต่ำ แต่จะพบรุนแรงมากขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้สูงอายุ

อาหารที่พบว่ามักจะเป็นสาเหตุของการระบาดได้แก่ อาหารประเภทเนื้อวัว เนื้อไก่ ผัก และเครื่องเทศ สำหรับการปนเปื้อนอาจมาจากฝุ่น ดิน มูลสัตว์ หรืออุปกรณ์เครื่องมือไม่สะอาดสำหรับอุณหภูมิในการหุงต้มธรรมดาไม่สามารถทำลายสปอร์ได้ เพราะสปอร์สามารถทนอุณหภูมิน้ำเดือดได้มากกว่าหนึ่งชั่วโมง นอกจากนี้การอุ่นอาหารให้ร้อนอีกครั้งด้วยอุณหภูมิประมาณ 70 – 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที จะเป็นการกระตุ้นให้มีการงอกของสปอร์ที่ยังหลงเหลืออยู่ในอาหาร และสามารถสร้างสารพิษขึ้นได้ การแช่เย็นหรือการแช่แข็งอาหารที่มีเซลล์ของเชื้อนี้หลงเหลืออยู่เป็นเวลานาน อาจทำให้เซลล์ตายได้ เซลล์จะหยุดการเจริญที่ -6 องศาเซลเซียส แต่ในขณะที่สปอร์ของเชื้อยังทนอยู่ได้ ดังนั้นจึงควรระมัดระวังขั้นตอนการผลิต และวิธีเก็บรักษาอาหารต่างๆ เพื่อลดการปนเปื้อนหรืออันตรายจากเชื้อนี้

8.6 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

-

8.7 ความปลอดภัย (Safety)

8.7.1 ต้องสวมเสื้อคลุมตลอดระยะเวลาปฏิบัติการเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ติดผิวหนังหรือเสื้อผ้า รวมทั้งป้องกันตัวเองและเสื้อผ้าจากการกระเด็นของสารเคมีและสิ่งสกปรกต่างๆ

8.7.2 ห้ามรับประทานอาหาร ดื่มหรือสูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนห้ามเคี้ยว หรือกัดดินสอ หรือปากกา

8.7.3 หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับหน้าหรือตาระหว่างปฏิบัติงาน

8.7.4 ก่อนและหลังปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อความสะอาดบริเวณปฏิบัติงานทุกครั้ง

8.7.5 ต้องติดฉลาก แสดง ชื่อ วันที่ ตัวอย่าง ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อหรืออื่นๆ ลงบน จานเพาะเชื้อหรืออุปกรณ์ ทดลองเพื่อป้องกันการล้างหรือนำไปทิ้งโดยไม่ตั้งใจ

8.7.6 ใช้ตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์ด้วยความระมัดระวัง ห้ามวางตะเกียงดังกล่าวไว้ใกล้ภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์หรือสารไวไฟต่างๆ รวมทั้งระมัดระวังมือและเส้นผม หรือส่วนต่างๆ ของร่างกายจากการถูกไฟลวก ดับตะเกียงทุกครั้งเมื่อเลิกใช้งาน

8.7.7 วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม จานเพาะเชื้อ หลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปล้าง

8.7.8 สไลด์ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปกำจัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

8.7.9 ก่อนและหลังปฏิบัติการทุกครั้งต้องล้างมือด้วยสบู่ และเช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (แอลกอออล์ 70) ทุกครั้ง

8.8. เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipments and supplies)

8.8.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณภูมิ 35 องศาเซลเซียส

8.8.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

8.8.3 เครื่องวัด pH (pH meter)

8.8.4 เครื่องชั่ง (Balance)

8.8.5 เครื่องแก้ว ได้แก่ Petri dishes, Pipette, Dilution bottle, Glass rod spreader, Slide

8.8.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

8.8.7 กรรไกรปลอดเชื้อ

8.8.8 ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (Stomacher bag)

8.8.9 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

8.8.10 Anaerobic jar ขนาด 2.5 ลิตร

8.8.11 เครื่องตีผสมอาหาร (Stomacher)

8.9 สารมาตรฐาน (Standard)

8.9.1 Iron Milk Medium

8.9.2 Lactose – Gelatin Medium

8.9.3 Liver Infusion Broth

8.9.4 Motility – Nitrate Medium

8.9.5 Nitrate detection reagents

8.9.6 Peptone diluent

8.9.7 Thioglycollate Medium

8.9.8 Trytose – Sulfite – Cycloserine agar (TSC)

- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 7.4 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ปรับ pH เป็น 7.4 แบ่งใส่หลอดๆ ละ 10 มิลลิลิตร และใส่หลอดดักแก๊ส (durham tube) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

8.10.1.4 Motility Nitrate Medium

ส่วนผสม

- Beef extract 3.0 กรัม
- Peptone 5.0 กรัม
- Potassium nitrate 5.0 กรัม
- Disodium phosphate 2.5 กรัม
- Galactose 5.0 กรัม
- Glycerol 5.0 กรัม
- Agar 3.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 7.4 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย 0.1N NaOH ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุในหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

8.10.1.5 Nitrate reduction reagents

สารละลาย ก.

ละลาย sulfanilic acid 0.5 กรัม และ glacial acetic acid 30.0 กรัม ในน้ำกลั่น 120 มิลลิลิตร

สารละลาย ข.

ละลาย N (1-napthyl) ethylenediamine dihydrochloride 0.2 กรัม และ glacial acetic acid 30.0 กรัม ในน้ำกลั่น 120 มิลลิลิตร

8.10.1.6 Peptone diluent

ส่วนผสม

- Peptone 1.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 7.0 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายเปปโตน 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

8.10.1.7 Fluid Thioglycolate Broth

ส่วนผสม

- Peptone from casein	15.0	กรัม
- Yeast extract	5.0	กรัม
- D(+) Gluclose	5.0	กรัม
- L-cystine	0.5	กรัม
- Sodium chloride	2.5	กรัม
- Sodium thioglycollate	0.5	กรัม
- Resazurine sodium	0.001	กรัม
- Distilled water	1.0	ลิตร

pH 7.0 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับพีเอชเป็น 7.0 ปรับด้วย 0.1 N NaOH ปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุในหลอดแก้วขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

8.10.1.8 TSC (Tryptose Sulphite egg-yolk Cycloserine Agar)

ส่วนผสม

- Tryptose	15.0	กรัม
- Peptone from soymeal	5.0	กรัม
- Yeast extract	5.0	กรัม
- Sodium disulfite	1.0	กรัม
- Ammonium-iron(lll) citrate	1.0	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย 0.1N NaOH ปรับปริมาตรเป็น ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ส่วนผสมเพิ่มเติม

ก. Egg yolk emulsion

วิธีเตรียม แช่ไข่ไก่ในเอทานอลเข้มข้น 70% นาน 1 ชั่วโมง แยกไข่แดงออกจากไข่ขาวโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ผสมไข่แดง 1 ส่วนกับน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% (normal saline) 1 ส่วน ปั่นที่ความเร็วสูงเป็นเวลา 5 วินาทีด้วย blender ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซสเซียส ก่อนนำไปใช้

ข. 4% Cycloserine

วิธีเตรียม ชั่ง Cycloserine 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน

วิธีเตรียม TSC แบบครบสูตร

เติม egg- yolk emulsion 40 มิลลิลิตร และ 4% cycloserine 5 มิลลิลิตร ลงในส่วนผสมพื้นฐาน (อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อ

8.10.2 วิธีการตรวจวิเคราะห์ *C. perfringens*

วิธีการวิเคราะห์ *C. perfringens* มี 2 วิธีการ ได้แก่

I). การตรวจนับจำนวนโคโลนี (Enumeration method) แสดงดังภาพ 8.2

II). Detection method (การตรวจเพื่อรายงานว่าพบหรือไม่พบ) แสดงดังภาพ 8.3

I. การตรวจนับจำนวนโคโลนี (Emumeration method)

Direct plate count method

เป็นการตรวจนับ *C. perfringens* ในอาหาร โดยนับได้ทั้ง Viable cell และ spore การเตรียมตัวอย่างอาหารเพื่อส่งตรวจวิเคราะห์ ควรส่งตัวอย่างทันทีที่ทำได้ ในกรณีที่ส่งตรวจทันทีไม่ได้ไม่ควรนำตัวอย่างแช่เย็นหรือแช่แข็งเป็นเวลานานๆ เพราะเซลล์ของ *C. perfringens* ไม่ทนความเย็นและการตายจะเพิ่มมากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะแช่เยือกแข็ง.

วิธีการวิเคราะห์ *C. perfringens* โดยวิธีการตรวจนับโคโลนี

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัมใน Peptone diluent (0.1% peptone) 225 มล.

(เจือจาง 1 :10)

↓

ทำการเจืองจางให้ได้ 10^{-1} ถึง 10^{-6}

↓

เท 6-7 มล. TSC ลงในเพลท

↓

วางไว้ให้ Agar แข็งตัว

ปิเปต ตัวอย่าง 1 มล. ทุก dilution ลงในจานเพาะเชื้อทำซ้ำ dilution ละ 2 จาน

↓

เท TSC 15 มล. ลงในจานเพาะเชื้อ แล้วหมุนเบาๆ ให้ agar ผสมกับตัวอย่างให้ทั่ว

↓

ทิ้งไว้ให้ Agar แข็งตัว นำเพลทไปใส่ใน Anaerobic jar

↓

บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 20-24ชั่วโมง

↓

เลือกเพลทที่มีโคโลนีสีดำ 25 – 250 โคโลนี นำมานับรายงานเป็น Clostridia cell ต่อกรัม

↓

นำไปทดสอบยืนยันต่อ

ภาพ 8.2 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *C. perfringens* โดยการตรวจนับโคโลนี

โคโลนีที่ให้ลักษณะเฉพาะของ *C. perfringens* ควรนำมาตรวจยืนยันในขั้นต้นและการทดสอบขั้นสมบูรณ์ต่อไป

การตรวจยืนยันในขั้นต้น (Presumptive medium test) โดยมีวิธีการดังนี้

1. เลือกโลนีสีดำบน TSC มา 10 โคโลนี
2. ใช้ลูปแตะโคโลนีแล้วใส่ในหลอด fluid thioglycolate Broth ที่ต้มไล่อากาศออกแล้ว หลอดละ 1 โคโลนี
3. บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง
4. ปิเปต 1 มิลลิลิตร ของ fluid thioglycolate broth ที่บ่มแล้วลงใน iron-milk medium
5. บ่มที่ 46 องศาเซลเซียส ใน water bath 2 ชั่วโมง
6. ตรวจดูการเกิด stormy fermentation ทุกชั่วโมง (นมจะจับตัวกันเป็นก้อน)
7. รายงานว่าเป็น *C. perfringens* โดยไม่ต้องทดสอบยืนยันในขั้นสมบูรณ์

หมายเหตุ ในกรณีที่ให้ผล stormy fermentation + vc หลังจาก 5 ชั่วโมงแล้ว **หรือในการศึกษาเพื่อหา**สาเหตุของเชื้อที่มีการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเกิดขึ้น ต้องทดสอบยืนยันในขั้นสมบูรณ์ต่อไป

การทดสอบยืนยันขั้นสมบูรณ์ (Completed confirmation test) โดยมีวิธีการดังนี้

1. ถ่ายเชื้อ thioglycollate broth ที่บ่มเชื้อไว้แล้ว 2 loop ลงใน motility – nitrate และ lactose – gelatin medium (stab หลายๆครั้ง)
2. บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
3. ตรวจผล *C. perfringens* โดยเทียบจากตาราง ตาราง 8.1

ผลการทดสอบ ปฏิกริยาชีวเคมีของ *C. perfringens* ให้ผลการทดสอบดังตารางที่ 8.1

วิธีการทดสอบ ปฏิกริยาชีวเคมี

- <u>การทดสอบการสร้างกรดและแก๊ส</u>

Lactose Gelatin Medium เปลี่ยนสีจากแดงเป็นเหลืองแสดงว่า แบคทีเรียสร้างกรด และแก๊ส จากนั้นนำหลอดทดสอบไปแช่เย็น 5 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง gelatin จะไม่แข็งตัว ถ้า gelatin แข็งตัว ให้นำไปบ่มต่อที่ 35 องศาเซลเซียส 24 - 48 ชั่วโมง แล้วดูผลอีกครั้ง

<u>ผล</u> *C. perfringens* : สร้างกรด และแก๊ส จากน้ำตาลแลกโตส และย่อย gelatin ภายใน 24 ชั่วโมง

- <u>การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท</u>

เติมซัลฟานิก แอซิด (reagent A) 0.5 มิลลิลิตร และแอลฟาแนพทอล (reagent) B 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ ตามลำดับ จะได้สีส้มภายใน 5 นาที ถ้าไม่มีสีให้เติมผง zinc metal ลงไป รอ 2 - 3 นาที ถ้าไม่มีสีส้มเกิดขึ้น แสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวซ์เป็นแก๊สไนโตรเจน ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นหลังเติมผงสังกะสี แสดงว่า เชื้อไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรทได้

ผล *C. perfringens* : รีดิวส์ไนเตรทได้

ตาราง 8.1 แสดงปฏิกิริยาชีวเคมีของ *C. perfringens* และ *Clostridium* สปีชีย์อื่น

	Motility - Gelatin Medium		Lactose - Gelatin Medium		Fermentation medium	
Species	Motility	Nitrite	Acid/gas	Gelatin liquefied	Salicin (24 h)	Raffinose (72 h)
C. perfringens Type A	-	4+	AG/T	+(48)	-	A
C. absonum	+	(+)	AG/CS	-	AG	-
C. baratii	-	3+	AG/CS	-	AG	-
C. celatum	-	2+	A/CS	-	A	-
C. paraperfringens	-	3+	AG/CS	-	AG	-
C. sardiniense	±	(+)	AG/CS	-	AG	-

A= acid; AG = acid and gas; T= turbid

CS = clear with sediment cell; + = positive; (+) = weak; - = negative

ที่มา : Downes และ ITO. (2001).

การรายงานผล

จำนวนโคโลนี/กรัมของอาหาร = A x C/B x D x 10

A = จำนวนโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดเฉลี่ยต่อ 1 เพลท

B = จำนวนโคโลนีที่เลือกมาทดสอบ

C = จำนวนโคโลนีที่ให้ผลถูกต้อง

D = Dilution factor เช่น เลือกเพลทของ dilution 10^{-3}, D = 10^{3}

X 10 หมายถึง ตัวอย่างเริ่มต้นเจือจางที่ 1 : 10

การทำ Spore count

ทดสอบตามแบบ Direct plate method แต่หลังจากใส่ตัวอย่าง 25 กรัม ลงใน peptone 225 ml แล้ว ให้แบ่งตัวอย่างใส่ใน screw cap tube แล้วแช่ใน water bath อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส 20 นาที แล้วจึงนำไปทำ dilution และลงจานเพาะเชื้อต่อไป

II. Detection method (การตรวจเพื่อรายงานว่าพบหรือไม่พบ)

ใช้ในกรณีที่ตัวอย่างอาหารมีโอกาสปนเปื้อนด้วย *C. perfringens* น้อย วิธีการตรวจวิเคราะห์ แสดงดังภาพ 8.5

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัมลงในหลอดที่มี Liver Infusion Broth 10 – 20 มล.
(ใส่ durham tube ในหลอดด้วย)
↓
บ่มที่ 35 -37 องศาเซลเซียส 20-24 ชั่วโมง
↓
เลือกหลอดที่ขุ่นและให้แก๊ส
↓
Streak บน TSC agar ที่เติม egg yolk 8%
↓
บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
↓
เลือกโคโลนีมีสีเทาแกมเหลือง (yellowish grey)
ขนาด 1 - 2 มม. โคโลนีล้อมรอบด้วยวงขาวขุ่น
เนื่องจากมีการย่อยของไข่แดง (lecthinase production)
↓
ใช้ loop แตะโคโลนีใส่ลงใน fluid thioglycolate broth
↓
บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง
↓
นำไปทดสอบยืนยันต่อไปเหมือนวิธีการตรวจนับ
↓
รายงานผลเป็นพบหรือไม่พบ (detected or not detected)

ภาพ 8.3 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *C. perfringens* เพื่อรายงานว่าพบหรือไม่พบ

บทปฏิบัติการที่ 9

การตรวจวิเคราะห์จำนวน *V. cholerae และ V. parahaemolyticus* ในอาหาร

9.1 ความมุ่งหมาย (Purpose)

เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์จำนวน *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในอาหาร

9.2 การใช้งาน (Application)

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์จำนวน *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในอาหาร

9.3 เอกสารอ้างอิง (References)

9.3.1 ธีรพร กงบังเกิด. **การตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* ในอาหาร.** เอกสารประกอบการสอน ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยนเรศวร. 3 หน้า.

9.3.2 บุญส่ง แสงอ่อน. (2547). **จุลชีวิทยาทางอาหารภาคปฏิบัติการ.** ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก. 76 หน้า.

9.3.3 ศิริโฉม ทุ่งเก้า. (2543). **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร.** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา. 158 หน้า.

9.3.4 AOAC. (1995). Official Methods of Analyses of Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Associations of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.

9.3.5 Downes, F.P. and ITO, K. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.4th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

9.3.6 ICMSF. (1998). **Microorganisms in Foods**. Blackie Academic and Profession, London.

9.3.7 U .S. Food and Drug Administration. (1995). **Bacteriological Analytical Manual.** 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

9.4 นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

9.4.1 Alkaline peptone water (0.5% NaCl)

9.4.2 Lysion Iron Agar (LIA)

9.4.3 Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBs)

9.4.4 Triple Sugar Iron Agar (TSI)

9.5 หลักการทางวิทยาศาสตร์ (principle)

Vibrio เป็นแบคทีเรียชนิด facultative anaerobe เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนตรงหรือโค้ง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ เป็นพวกชอบเกลือ (halophile) เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) และคะตะเลส catalase ได้ หมักน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่ได้ก๊าซเป็นผลผลิต Vibrio ชนิดที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ที่สำคัญได้แก่ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus*

V. cholerae

Vibrio ชนิดนี้เป็นสาเหตุของอาการ อหิวาตกโรค (cholera) ที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อน *V. cholerae* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรค เรียกว่า ซีโรไทป์ โอวัน (serotype O 1) สำหรับซีโรไทป์ที่มีสมบัติทางชีวเคมีเหมือนหรือคล้ายกับซีโรไทป์ โอวัน เมื่อทดสอบกับแอนติซีรัมต่อแอนติเจนชนิด กลุ่ม 1 ของ *V. cholerae* จะไม่เกิดการเกาะกลุ่มจึงจัดเป็น ซีโรไทป์ นอน-โอวัน (serotype non-O1) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาการรุนแรงน้อยกว่าพวกแรก ซีโรไทป์ โอวันอาจแบ่งได้ออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ Inaba Ogawa และ Higojima ถิ่นที่อยู่ของ *V. cholerae* ได้แก่ น้ำทะเลบริเวณชายฝั่ง ตะกอนดิน และสัตว์ทะเล โดยพบมากในเขตร้อนและเขตอบอุ่น นอกจากนั้นยังพบ Vibrio ชนิดนี้ได้ในน้ำกร่อยและน้ำจืด อาหารที่มักเป็นสาเหตุการระบาดของเชื้อนี้ ได้แก่ อาหารทะเลสดหรือปรุงไม่สุก ผักสด รวมทั้งอาหารที่ผ่านกรรมวิธีที่มีการปนเปื้อนของเชื้อลงไปภายหลัง

V. parahaemolyticus

ลักษณะสำคัญของ Vibrio ชนิดนี้คือ ต้องการเกลือในการเจริญ (halophile) โดยเจริญได้เมื่อมีเกลือความเข้มข้น 0.5 – 8.0 % ดังนั้น จึงไม่พบ Vibrio ชนิดนี้ในน้ำจืด ช่วง pH ที่เจริญได้คือ 4.8 - 11.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถรอดชีวิตในอุณหภูมิต่ำกว่า 5 - 7 องศาเซลเซียส แต่มีชีวิตอยู่ได้ค่อนข้างนานในอุณหภูมิเยือกแข็ง สายพันธุ์ที่ก่อโรคผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงชนิดทนความร้อน (heat stable hemolysis) การทดสอบเพื่อหาเอนไซม์ชนิดนี้เรียกว่า Kanagawa test อาการที่ได้รับอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรียชนิดนี้เรียกว่า กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastro enteritis) มักพบการระบาดในอาหารทะเลดิบหรือปรุงไม่สุกจากทะเลเขตร้อนหรือเขตอบอุ่น อาหารที่มักพบเชื้อนี้ คือ อาหารประเภทปลา กุ้ง หอย ปู ที่ดิบๆ หรือ ดิบๆ สุกๆ

อาการ จะมีอาการผิดปกติขึ้นหลังจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อชนิดนี้เข้าไปประมาณ 2 - 48 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสุขภาพ อายุ เพศ และปริมาณที่บริโภค อาการที่เกิดขึ้นคือ ปวดท้อง ท้องเดิน คลื่นไส้ อาเจียน บางครั้งพบว่ามีไข้ หนาวสั่น และปวดศีรษะด้วย ผู้ป่วยจะหายเองภายใน 2 - 5 วัน อัตราผู้ป่วยที่ตายด้วยเชื้อนี้ต่ำมาก ส่วนใหญ่มักพบในเด็ก คนชรา และผู้มีร่างกายอ่อนแอ

9.6 เอกสารที่เกี่ยวข้อง (Associted document)

-

9.7 ความปลอดภัย (Safety)

9.7.1 ต้องสวมเสื้อคลุมตลอดระยะเวลาปฏิบัติการเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ติดผิวหนังหรือเสื้อผ้า รวมทั้งป้องกันตัวเองและเสื้อผ้าจากการกระเด็นของสารเคมีและสิ่งสกปรกต่างๆ

9.7.2 ห้ามรับประทานอาหาร ดื่มหรือสูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนห้ามเคี้ยว หรือกัดดินสอปากกา

9.7.3 หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับหน้าหรือตาระหว่างปฏิบัติงาน

9.7.4 ก่อนและหลังปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อความสะอาดบริเวณปฏิบัติงานทุกครั้ง

9.7.5 ต้องติดฉลาก แสดง ชื่อ วันที่ ตัวอย่าง ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อหรืออื่นๆ ลงบน จานเพาะเชื้อหรืออุปกรณ์ ทดลองเพื่อป้องกันการล้างหรือนำไปทิ้งโดยไม่ตั้งใจ

9.7.6 ใช้ตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์ด้วยความระมัดระวัง ห้ามวางตะเกียงดังกล่าวไว้ใกล้ภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์หรือสารไวไฟต่างๆ รวมทั้งระมัดระวังมือและเส้นผม หรือส่วนต่างๆ ของร่างกายจากการถูกไฟลวก ดับตะเกียงทุกครั้งเมื่อเลิกใช้งาน

9.7.7 วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม จานเพาะเชื้อหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปล้าง

9.7.8 สไลด์ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปกำจัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

9.7.9 ก่อนและหลังปฏิบัติการทุกครั้งต้องล้างมือด้วยสบู่ และเช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (แอลกอฮอล์ 70) ทุกครั้ง

9.8 เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipments and supplies)

9.8.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณภูมิ 35 องศาเซลเซียส

9.8.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

9.8.3 เครื่องวัด pH (pH meter)

9.8.4 เครื่องชั่ง (Balance)

9.8.5 เครื่องแก้ว ได้แก่ Petri dishes, Pipette, Dilution bottle, Glass rod

spreader, Slide

9.8.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

9.8.7 กรรไกรปลอดเชื้อ

9.8.8 ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (stomacher bag)

9.8.9 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

9.9 สารมาตรฐาน (Standards)

9.9.1 Alkaline peptone water (0.5% NaCl)

9.9.2 Bile Esculin Broth (BE)

9.9.3 Lysion Iron Agar (LIA)

9.9.4 Motile-Indole-Lysine Medium (MIL)

9.9.5 6.5% NaCl

9.9.6 Ornithine Decarboxylase Medium (ODC medium)

9.9.7 Peptone Broth (PB)

9.9.8 Peptone Broth Saline (PBS)

9.9.9 PR Mannitol

9.9.10 Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBs)

9.9.11 Triple Sugar Iron Agar (TSI)

9.10 วิธีดำเนินการ (Procedures)

9.10.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

9.10.1.1 Alkaline peptone water (with 0.5% NaCl)

ส่วนผสม

- Peptone 10.0 กรัม
- Sodium chloride 5.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 8.6 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.6 ด้วย 1 N NaOH ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

9.10.1.2 Bile Esculin (BE)

ส่วนผสม

- ผงสำเร็จรูป Bile esculin 64.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 6.8 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับpHเป็น 6.8 ด้วย 1N NaOH ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

9.10.1.3 Lysion Iron Agar (LIA)

ส่วนผสม

- Peptone 5.0 กรัม
- Yeast extract 3.0 กรัม
- Glucose 10.0 กรัม
- L-lysine hydrochloride 10.0 กรัม
- Ferric ammonium citrate 0.5 กรัม
- Sodium thiosulphate 0.04 กรัม
- Bromcresol purple 0.02 กรัม
- Agar 15.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 8.6 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 8.6 ด้วย 1N NaOH ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ต้มจนเดือดประมาณ 10 นาที (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ)

9.10.1.11 Triple Sugar Iron Agar

ส่วนผสม

- Peptone 20.0 กรัม
- Lactose 10.0 กรัม
- Sucrose 10.0 กรัม
- Glucose 1.0 กรัม
- Ferrous sulphate 0.2 กรัม
- Sodium chloride 5.0 กรัม
- Sodiumthiosulphate pentahydrate 0.3 กรัม
- Phenol red 0.024 กรัม
- Agar 15.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 7.4 + 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย 1N NaOH ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนอาหารแข็งตัวนำหลอดอาหารมาวางในลักษณะเอียงผิวหน้า (slant)

9.10.2 วิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวน *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus*

การตรวจสอบอาหารว่ามี *V. cholerae* และ หรือ *V. parahaemolyticus* ปนเปื้อนอยู่หรือไม่ อาศัยสมบัติของเชื้อ ได้แก่ การทนต่อเกลือน้ำดี (bile salts) การชอบเจริญในสภาวะด่างและการทนเกลือ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. การเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว

อาหารเหลวที่ใช้เพิ่มจำนวน *V. cholerae* ได้แก่ Alkaline peptone water ที่มี pH เป็นด่างคือ 8.6 และมีเกลือความเข้มข้น 0.5% นอกจากนั้น ยังอาจเพาะเลี้ยงด้วย gelatin phosphate salts broth สำหรับ *V. parahaemolyticus* นั้นอาจเพิ่มจำนวนใน Alkaline peptone water เช่นเดียวกันแต่เพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็น 2-3 เปอร์เซ็นต์ หรืออาจเพาะเลี้ยงด้วย glucose salt teepol broth

2. การเพาะแยกเชื้อบนอาหารแข็งชนิดคัดเลือก (Selective media)

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่นิยมใช้เพาะแยก *Vibrio* โดยทั่วไป ได้แก่ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) Agar อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้มีซูโครสเป็นส่วนผสม และมีบรอมไธมอลบลูเป็นอินดิเคเตอร์ของการเปลี่ยน pH เมื่อ *V. cholerae* รวมทั้ง *Vibrio* อื่นบางชนิด เช่น *V. fluvialis* และ *V. algiolyticus* เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะให้โคโลนีสีเหลืองเนื่องจากสามารถหมักซูโครสได้ สำหรับ *V. parahaemolyticus* รวมทั้ง *V. vulnificus* จะให้โคโลนีสีเขียวเนื่องจากไม่หมักซูโครส ลักษณะโคโลนีของ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* บน TCBS agar แสดงในตาราง 9.1

ตาราง 9.1 ลักษณะโคโลนีของ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* บนอาหารแข็ง TCBS agar

ชนิดของ *Vibrio*	ลักษณะโคโลนี
V. cholerae	ขนาด 2 - 3 มิลลิเมตร สีเหลือง กลม ผิวเรียบ แบนเล็กน้อย ขอบโคโลนีใส
V. parahaemolyticus	ขนาด 2 – 4 มิลลิเมตร สีเขียวอมฟ้า กลม ผิวเรียบ ทึบแสง มีจุดสีเขียวเข้มตรงกลาง

3. การทดสอบทางชีวเคมี

โคโลนีที่ให้ลักษณะเฉพาะของ *V. cholerae* หรือ *V. parahaemolyticus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar ควรนำมาทดสอบสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ การผลิตออกซิเดส ซึ่ง *Vibrio* ทั้งสองชนิดให้ผลบวก และเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Iron (TSI) Agar และ Lysine Iron Agar (LIA) ซึ่ง *V. cholerae* ให้ผลการทดสอบดังตาราง 9.2

ตาราง 9.2 การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นสำหรับ *V. cholerae*

อาหารเลี้ยงเชื้อ	การเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีการเจริญของ *V. cholerae*	การอ่านผล	การบันทึกผล
TSI agar	ส่วนเอียงมีสีเหลือง ส่วนก้นมีสีเหลือง ไม่มีรอยแตก ไม่มีสีดำ	หมักซูโครส หมักกลูโคส ไม่ผลิตก๊าซ ไม่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์	Acid slant Acid bult Gas – H_2S -
LIA	เปลี่ยนเป็นสีม่วง ไม่มีสีดำ	ผลิตไลซีนดีคาร์บอกซิเลส ไม่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์	LDC + H_2S -

สำหรับ *V. parahaemolyticus* นั้น ให้ผลการทดสอบบน TSI agar และ LIA คล้ายคลึงกับ *V. cholerae* แต่ต่างกันที่ *V. parahaemolyticus* ทำให้ส่วนเอียงของ TSI agar ยังคงเป็นสีแดง (alkaline slant) เนื่องจากไม่หมักซูโครส

1. วิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวน *V. parahaemolyticus*

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ถุงปลอดเชื้อเติมสารละลาย APW ที่มี 3 % NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ถ้าตัวอย่างอาหารมีชิ้นใหญ่ให้ใช้กรรไกรไร้เชื้อตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปตีผสมด้วยเครื่องเป็นเวลา 60 วินาที

2. นำไปเจือจางใน sterile normal saline โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายจากจากข้อ 1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร โดยเจือจางจนถึง 10^{-3}

3. ใช้ปิเปต ดูดสารละลายที่ความเจือจางต่างๆ จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBs ทำการ spread plate แล้วนำไปบ่มอุณหภูมิ 35 -37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง

4. นับจำนวนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยดูจากลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเชื้อนี้มีลักษณะเฉพาะคือ โคโลนีกลม สีเขียว หรือเขียวแกมน้ำเงิน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิลิตร และมีลักษณะหนืด

5. ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากข้อ 4 มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ thiosulfate citrate bile salt agar (TCBS) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ นำไปบ่มที่ 35 -37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 -18 ชั่วโมง

6. นำเชื้อที่ต้องการตรวจสอบจากข้อ 5 มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเปรียบเทียบกับเชื้อควบคุม *V. parahaemolyticus* ดังนี้

6.1 Oxidase test โดยหยด oxidase reagent ลงกระดาษกรอง แล้วใช้ลูปเขี่ยเชื้อมาป้ายที่กระดาษกรอง อ่านผลดังนี้

ผลบวก รอยขีดเชื้อเป็นสีน้ำเงินเข้ม

ผลลบ ไม่มีการเปลี่ยนสี

V. parahaemolyticus: ให้ผลบวก

6.2 ถ่ายเชื้อลงใน TSI slant บ่มที่อุณหภูมิ 35 -37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง อ่านผลได้ดังนี้

K/A - ผิววุ้นเปลี่ยนเป็นสีแดง ก้นหลอดเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

A/A- ผิววุ้นและก้นหลอดเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

K/N, N/N, K/K- N ไม่เกิดการเปลี่ยนสี, K เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม

เกิดก๊าซ เห็นรอยแตกหรือฟองอากาศ

เกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะเห็นสีดำก้นหลอด

V. parahaemolyticus จะให้ผล K/A ไม่เกิดก๊าซ และไฮโดรเจนซัลไฟด์

6.3 แทงเชื้อ (stab) ลงใน Motile-Indole-Lysine medium บ่มที่อุณหภูมิ 35 -37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วทำการอ่านผล

Motility test

ผลบวก เชื้อที่เจริญออกมานอกรอย stab ทำให้อาหารขุ่น

ผลลบ เชื้อเจริญเฉพาะรอย stab

Lysine decarboxylase test (LDC)

ผลบวก อาหารส่วนล่างมีสีม่วง

ผบลบ อาหารส่วนล่างเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

Lysine deaminase test (LDA)

ผลบวก มีสีแดงที่ผิวหน้าอาหาร(ประมาณ1/4 ของหลอด)

ผลลบ ไม่เกิดสีแดงบนผิวหน้าอาหาร

Indole test

ผลบวก เกิดชั้นสีแดง

ผลลบ ไม่เกิดชั้นสีแดง

V. parahaemolyticus ให้ผล Motile+, LDC+, LDA-, Indole+

6.4 ใส่เชื้อลงในอาหาร Ornithine Decarboxylase medium (ODC medium) บ่มที่อุณหภูมิ 35 -37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลดังนี้

ผลบวก อาหารมีสีม่วง

ผลลบ อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

V. parahaemolyticus ให้ผลบวก

6.5 ใส่เชื้อลงในอาหาร 6.5% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 35 -37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลดังนี้

ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนแปลง

V. parahaemolyticus สามารถเจริญได้ ให้ผลบวก

6.6 ใส่เชื้อลงในอาหาร Peptone broth(PB) บ่มที่อุณหภูมิ 35 -37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลดังนี้

ผลบวก อาหารจะขุ่น

ผลลบ อาหารจะใส ไม่ขุ่น

V. parahaemolyticus ให้ผลลบ

6.7 ใส่เชื้อลงในอาหาร Peptone broth saline (PBS) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง อ่านผลดังนี้

ผลบวก อาหารจะขุ่น

ผลลบ อาหารจะใสไม่ขุ่น

V. parahaemolyticus ให้ผลบวก

6.8 แทงเชื้อ (stab) ลงในอาหาร Bile esculin(BE) บ่มที่อุณหภูมิ 35 -37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลดังนี้

ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นสีดำ

ผลลบ อาหารไม่เปลียนสี

V. parahaemolyticus ให้ผลลบ

6.9 ใส่เชื้อลงในอาหาร PR Mannitol บ่มที่อุณหภูมิ 35 -37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 -18 ชั่วโมง อ่านผลดังนี้

ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ผลลบ อาหารเป็นสีเดิม

V. parahaemolyticus ให้ผลลบ

7. แปลผลเชื้อจากผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีว่าเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือไม่ และลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อที่น่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* แสดงดังตาราง 9.3

การวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเล

แผนภาพ การวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเล แสดงดังภาพ 9.1

ทำตัวอย่างให้ละเอียด ชั่ง 25 กรัม ใส่ในถุงปลอดเชื้อ
เติมสารละลาย APW ที่มี 3% NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร
นำไปตีผสมด้วยเครื่องเป็นเวลา 60 วินาที

↓

บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 8-24 ชั่วโมง

↓

ขีดแยกเชื้อบนจานอาหาร TCBS agar 2 จาน และขีดแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus*
อ้างอิงลงบน TCBS agar อีก 1 จาน
บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง

↓

ตรวจหาโคโลนีลักษณะเฉพาะของ *V. parahaemolyticus*
จากตัวอย่างอาหารโดยเปรียบเทียบกับโคโลนีของเชื้ออ้างอิง

↓

เพาะโคโลนีลักษณะเฉพาะจากตัวอย่างและโคโลนีอ้างอิงลงอาหารเลี้ยงเชื้อ
TSI agar ที่มี 2% NaCl และ LIA ที่มี 2% NaCl
บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

↓

ทดสอบการเจริญใน tryptone broth ที่มี NaCl ความเข้มข้น 6 และ 8 %

↓

การหมักเซลโลไบโอส

↓

สรุปผล พบหรือไม่พบ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่าง 25 กรัม

ภาพ 9.1 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *V. parahaemolyticus*

<u>วิธีการทดสอบการเจริญในเกลือความเข้มข้นต่างๆ</u>

1. เพาะเชื้อในอาหารเหลว tryptone broth ที่มี NaCl ความเข้มข้น 6 และ 8 %
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

<u>ผลของ *V. parahaemolyticus*</u> : พบการเจริญจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NaCl ความเข้มข้น 6 และ 8

<u>วิธีการทดสอบการหมักเซลโลไบโอส</u>

1.. เพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ cellobiose fermentation broth
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

<u>ผลของ *V. parahaemolyticus*</u> : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ผลลบ)

2. การตรวจวิเคราะห์ *V. cholerae*

แผนภาพการตรวจวิเคราะห์ *V. cholera* แสดงดังภาพ 9.2

ทำตัวอย่างให้ละเอียด ชั่ง 25 กรัม ใส่ในถุงปลอดเชื้อ
เติมสารละลาย APW ที่มี 0.5% NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร
นำไปตีผสมด้วยเครื่องเป็นเวลา 60 วินาที
↓
บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6-8 ชั่วโมง
↓
ขีดแยกเชื้อบนจานอาหาร TCBS agar 2 จาน และเพาะเชื้อ *V. choleraes*
อ้างอิงลงบน TCBS agar อีก 1 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง
↓
ตรวจหาโคโลนีลักษณะเฉพาะของ *V. choleraes*
จากตัวอย่างอาหารโดยเปรียบเทียบกับโคโลนีของเชื้ออ้างอิง
↓
เพาะโคโลนีลักษณะเฉพาะจากตัวอย่างและโคโลนีอ้างอิง
ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI agar และ LIA
บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง
↓
ทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส และ string test
↓
นำเชื้อจากหลอด TSI มาทดสอบการเกาะกลุ่มกับแอนติบอดีต่อ *V. cholerae* ชนิดโพลิวาเลนท์ โอ
วัน โดยวิธี Slide agglutination
↓
สรุปผล พบหรือไม่พบ *V. cholerae* ในตัวอย่าง 25 กรัม

ภาพ 9.2 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *V. cholerae*

<u>วิธีการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส</u>

1. หยดสารละลาย tetramethyl –*p*-phenylenediamine hydrochloride 2-3 หยด ลงบนแผ่นกระดาษกรองที่วางในจานเพาะเชื้อสะอาด
2. ใช้ห่วงแพลทตินัม หรือไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยโคโลนี และป้ายลงบนแผ่นกระดาษกรอง

<u>ผลของ *V. cholerae*</u> : เกิดสีม่วงภายในเวลา 5-10 วินาที (ผลบวก)

<u>วิธีการการทดสอบ string test</u>

1. เขี่ยเชื้อ 1 ห่วง ผสมสารละลาย 0.5% sodium deoxycholate ในสารละลาย NaCl เข้มข้น 0.85% 1 หยด บนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 60 วินาที
2. ใช้ห่วงแตะส่วนผสมยกขึ้นสูง 2-3 เซนติเมตรเพื่อตรวจสอบ

<u>ผลของ *V. cholerae*</u> : ส่วนผสมยืดเป็นสาย (ผลบวก)

ตาราง 9.3 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อที่น่าจะเป็น *V. cholera* และ *V. parahaemolyticus*

		V. cholerae	*V. parahaemolyticus*
TCBS agar		Y	G
Oxidase		+	+
Arginine dihydrolase		–	–
Ornithine decarboxylase		+	+
Lysine decarboxylase		+	+
Growth in (w/v):	0% NaCl	+	–
	3% NaCl	+	+
	6% NaCl	–	+
	8% NaCl	–	+
	10% NaCl	–	–
Growth at 42องศาเซลเซียส		+	+
Acid from:	Sucrose	+	–
	D-Cellobiose	–	V
	Lactose	–	–
	Arabinose	–	+
	D-Mannose	+	+
	D-Mannitol	+	+
	ONPG	+	–
	Voges-Proskauer	V	–
Sensi-tivity to:	10 µg O/129	S	R
	150 µg O/129	S	S
	Gelatinase	+	+
	Urease	–	V

Abbreviations: TCBS, thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose; mCPC, modified cellobiose-polymyxin B-colistin; AGS, arginine-glucose slant;

Y = yellow NG = no or poor growth S = susceptible nd = not done

G = green V = variable among strains R = resistant P = purple, V = variable

KK = Slant alkaline / Butt alkaline KA = Slant alkaline /Butt acidic, Ka = Slant alkaline/ Butt slightly acidic

ที่มา : Downes และ ITO. (2001)

บทปฏิบัติการที่ 10
การตรวจวิเคราะห์จำนวน *Bacillus cereus* ในอาหาร

10.1 ความมุ่งหมาย (Purpose)

เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์จำนวน *Bacillus cereus* ในอาหาร

10.2 การใช้งาน (Application)

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์จำนวน *Bacillus cereus* ในอาหาร

10.3 เอกสารอ้างอิง (References)

10.3.1 สร้อยทอง สายหยุดทอง. (2541). **การตรวจนับ *Bacillus cereus* ในอาหาร.** เอกสารของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 4 หน้า.

10.3.2 ศิริโฉม ทุ่งเก้า. (2543). ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา. 158 หน้า.

10.3.3 AOAC. (1995). Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. 6th ed. Associations of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.

10.3.4 Downes, F.P. and ITO, K. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

10.3.5 Granum, P.E. (1994). *Bacillus cereus* and its toxins. J. Appl. Bacterial. Symp. Suppl. 76: 61S-66S.

10.3.6 Shinagawa, K. (1993). Serology and characterization of *Bacillus cereus* in relation to toxin production. Bull. Int. Dairy Fed. 287: 42-49. Speijers.

10.3.7 Tallent, S. M., Kotewicz K. M. and Bennett R.W. (2002). ***Bacillus cereus.*** **Bacteriological Analytical Manual** (BAM) [online]. สืบค้นจาก : http://www.fda. gov/Food/ Science Research/ Laboratory Methods/Bacteriological Analytical Manual AM/ucm064948.htm เมื่อวันที่ 17 มกราคม 2556

10.4 นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

10.4.1 MYP = Mannitol–Egg-yolk–Polymyxin-Agar

10.4.2 Gram staining = การย้อมแกรม

10.4.3 Catalase test = การทดสอบคะตะเลส ทดสอบโดยหยด H_2O_2 3 % ลงบนโคโลนีของเชื้อ ตรวจสอบการเกิดฟองแก๊ส ถ้าพบฟองแก๊สรายงานผลบวก

10.4.4 Lecithinase = การทดสอบการย่อยเลซิทิเนส

10.4.5 Motility = การเคลื่อนที่ ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบในหลอดอาหารทดสอบ

10.4.6 Acid from mannitol = การผลิตกรดจากแมนนิทอล

10.4.7 Hemolysis = การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

10.4.8 Rhizoid growth = การเจริญแผ่คล้ายรากไม้

10.5 หลักการทางวิทยาศาสตร์ (principle)

รูปร่างลักษณะทั่วไป

B. cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนขนาดใหญ่สามารถสร้างสปอร์ที่ทนความร้อนและเจริญได้ดีในที่มีอากาศ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือที่ 30 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 4 – 50 องศาเซลเซียส และค่า pH 4.9-9.3 สปอร์ของ *B. cereus* มีขนาดเล็กกว่าเซลล์ เคลื่อนที่ได้ สร้างเอนไซม์ hemolysis และเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้ สร้างสารเรนินทำให้น้ำนมจับตัวเป็นก้อนแข็ง สามารถพบการระบาดของเชื้อโรคนี้ในอาหารหลายประเภท เช่น ในอาหารที่มีผักเป็นองค์ประกอบ ข้าวหุงสุก ข้าวผัด คัสตาร์ด ซุป ไข่ และนม

สารพิษ *B. Cereus* จะสร้างสารพิษ ได้ 2 ชนิด คือ

1. emetic toxin เป็นสารประเภทโปรตีนชนิด ring form ไม่เป็นแอนติเจน มีคุณสมบัติสามรถ ทนความร้อนที่ใช้ในขบวนการฆ่าเชื้อ คือ 121 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 90 นาที และทนอยู่ในสภาวะ pH 2 - 11 ได้ ไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน สารพิษนี้จะถูกสร้างในอาหารที่อุณหภูมิ 25 - 32 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษชนิด Emetic type

2. enterotoxin เป็นสารประเภทโปรตีน มีคุณสมบัติในการทำลายเม็ดเลือดแดงได้ สารพิษนี้จะถูกสร้างขึ้นเมื่อสปอร์ของ *B. cereus* ที่ทนความร้อนได้และปนเปื้อนอยู่ในอาหารผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็ก ก็จะเจริญเป็นเซลล์ใหม่ และสร้าง enterotoxin ขึ้น ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษชนิด Diarrheal type

ความสำคัญในการก่อโรค

สาเหตุของอาหารเป็นพิษจาก *B. cereus* มักเกิดจากสปอร์ที่ทนความร้อนได้ดี ส่วนตัวเซลล์จะถูกทำลายหมดไปในกระบวนการปรุงอาหารโดยผ่านความร้อนที่เพียงพอแล้ว ในสภาวะเช่นนี้เชื้ออื่นจะถูกทำลายหมดจึงไม่มีการแย่งที่ และแย่งอาหารในการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นเมื่ออาหารอาหารเย็นลงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 48 องศาเซลเซียส ทำให้สปอร์ที่หลงเหลืออยู่ในอาหารสามารถเจริญขึ้นได้ นอกจากนี้ยังพบคุณสมบัติพิเศษของสปอร์ *B. cereus* คือมีลักษณะเป็น hydrophobic หมายถึง ไม่ชอบเกาะกับโมเลกุลของน้ำ ดังนั้นจึงเกาะติดกับเครื่องมือ เครื่องใช้ ในการผลิตอาหาร ทำให้ล้างออกได้ยาก และที่ผิวของสปอร์ยังมี pili (ขนเล็กๆ) ที่สามารถเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก ทำให้สามารถงอกขึ้นและสร้าง enterotoxin ได้

การก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษของ *B. cereus*

เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนประมาณ 10^8 เซลล์ต่อกรัม จึงแสดงอาการของโรค โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *B. cereus* แบ่งได้เป็น 2 แบบ

อาการของอาหารเป็นพิษจาก *B cereus*

1.ท้องเสีย (Diarrheal syndrome) อาการแบบนี้จะพบเป็นส่วนใหญ่ในผู้ป่วยอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *B. cereus* เกิดจากสารพิษ enterotoxin ที่สร้างในขณะที่เซลล์เจริญเติบโตในลำไส้เล็ก มีอาการปวดท้อง ท้องร่วง และคลื่นไส้ ระยะฟักตัวของโรค 4 -16 ชั่วโมง และอาการของโรคจะหายได้เองภายใน 12 - 24 ชั่วโมง

2. คลื่นไส้อาเจียน (Emetic syndrome) เกิดจากสารพิษชนิด Emetic toxin ที่เซลล์สร้างขึ้นในขณะที่เจริญแบ่งตัวในอาหาร ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้อาเจียนอย่างรวดเร็ว ภายใน 1 - 5 ชั่วโมง หลังรับประทานอาหารที่มีสารพิษเข้าไป อาจไม่พบอาการท้องร่วงร่วมด้วยก็ได้

รายละเอียดของโรคอาหารเป็นพิษทั้ง 2 แบบ สามารถดูได้จากตาราง 10.1

ตารางที่ 10.1 ลักษณะของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *Bacillus cereus*

ลักษณะ	โรคอาหารเป็นพิษแบบท้องเสีย	โรคอาหารเป็นพิษแบบอาเจียน
ปริมาณของเชื้อที่ก่อโรค	$10^5 - 10^7$ CFU/g (ml)	$10^5 - 10^7$ CFU/g (ml)
ตำแหน่งการสร้างสารพิษ	สร้างในลำไส้เล็กของคนหรือ host	ปรากฏในอาหาร
ประเภทของสารพิษ	โปรตีน; Enterotoxin : Hbl, Nhe และ CytK	cyclic peptide; emetic toxin (cereulide)
ระยะฟักตัว	8 - 16 ชั่วโมง	0.5 – 5 ชั่วโมง
ระยะเวลาแสดงอาการ	12 – 24 ชั่วโมง	6 – 24 ชั่วโมง
อาการของโรค	ปวดท้อง ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ	คลื่นไส้ อาเจียน คลื่นเหียนวิงเวียน ครั่นเนื้อ ครั่นตัว
อาหารที่เป็นสาเหตุ	อาหารประเภทโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ไข่ ขนม หวาน ซุป พุดดิ้ง นมและผลิตภัณฑ์นม ผักและซอส	อาหารจำพวกแป้ง เช่น ผลิตภัณฑ์ข้าว ธัญพืช พาสต้า

ที่มา: Granum (1994); Shinagawa (1993)

10.6 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

ตาราง Most Probable Number

10.7. ความปลอดภัย (Safety)

10.7.1 ต้องสวมเสื้อคลุมตลอดระยะเวลาปฏิบัติการเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ติดผิวหนังหรือเสื้อผ้า รวมทั้งป้องกันตัวเองและเสื้อผ้าจากการกระเด็นของสารเคมีและสิ่งสกปรกต่างๆ

10.7.2 ห้ามรับประทานอาหาร ดื่มหรือสูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนห้ามเคี้ยว หรือกัดดินสอ ปากกา

10.7.3 หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับหน้าหรือตาระหว่างปฏิบัติงาน

10.7.4 ก่อนและหลังปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อความสะอาดบริเวณปฏิบัติงานทุกครั้ง

10.7.5 ต้องติดฉลาก แสดง ชื่อ วันที่ ตัวอย่าง ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อหรืออื่นๆ ลงบน จานเพาะเชื้อหรืออุปกรณ์ ทดลองเพื่อป้องกันการล้างหรือนำไปทิ้งโดยไม่ตั้งใจ

10.7.6 ใช้ตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์ด้วยความระมัดระวัง ห้ามวางตะเกียงดังกล่าวไว้ใกล้ภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์หรือสารไวไฟต่างๆ รวมทั้งระมัดระวังมือและเส้นผม หรือส่วนต่างๆ ของร่างกายจากการถูกไฟลวก ดับตะเกียงทุกครั้งเมื่อเลิกใช้งาน

10.7.7 วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม จานเพาะเชื้อ หลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปล้าง

10.7.8 สไลด์ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปกำจัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

10.7.9 ก่อนและหลังปฏิบัติการทุกครั้งต้องล้างมือด้วยสบู่ และเช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์) ทุกครั้ง

10.8 เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and supplies)

10.8.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

10.8.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

10.8.3 กระดาษวัด pH (pH paper)

10.8.4 เครื่องชั่ง (Balance)

10.8.5 เครื่องแก้ว ได้แก่ Petri dihes, Pipette, Dilution bottle, Glass rod Spreader, Slide

10.8.6 หลอดดักก๊าซ (Durham tube)

10.8.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

10.8.8 กรรไกรปลอดเชื้อ

10.8.9 ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (Stomacher bag)

10.8.10 เครื่องตีผสมอาหาร (Stomacher)

10.8.11 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

10.9 สารมาตรฐาน (Standard)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

10.9.1 Butterfield's phosphate – buffered dilution water

10.9.2 Egg Yolk Emulsion 50%

10.9.3 Motility – Nitrate Medium

10.9.4 Mannitol-Egg-yolk-Polymyxin Agar

10.9.5 Nitrate detection reagents

10.9.6 Phenol Red Glucose Broth

10.9.7 Polymyxin B sulfate

10.9.8 Trypticase Soy – Polymyxin Broth

10.9.9 Tryticase Soy – Sheep Blood Agar

10.10 วิธีดำเนินการ (Procedures)

10.10.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

10.10.1.1 Butterfield's Phosphate – buffered dilution water

ก. Stock Solution

- KH_2PO_4	34.0	กรัม
- น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

<u>วิธีการเตรียม</u>

ละลาย Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 34 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย 1 N NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส หรือที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บไว้ในตู้เย็น

ข. Dilution Blanks

นำ Stock Solution มา 1.25 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองบรรจุ 9 มิลลิลิตร บรรจุขวดแก้วทนร้อน 90 มิลลิลิตร และ 225 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส หรือที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

10.10.1.2 Motility-Nitrate Medium

<u>ส่วนผสม</u>

- Beef extract	3.0	กรัม
- Peptone	5 .0	กรัม
- KNO_3	1.0	กรัม
- Na_2HPO_4	2.5	กรัม
- Galactose	5.0	กรัม
- Glycerin	5.0	มิลลิลิตร
- Agar	3.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.3 $\pm$ 0.2

<u>วิธีการเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้น Agar ปรับ pH เป็น 7.3 เติม Agar แล้วต้มให้ละลาย แบ่งใส่หลอดขนาด 13 x 100 mm หลอดๆละ 3 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ถ้าไม่ใช้ภายใน 4 ชั่วโมง ต้องต้มให้เดือด 10 นาที ก่อนทดสอบเก็บในตู้เย็น

10.10.1.3. Mannitol-Egg-yolk- Polymyxin Agar

ส่วนผสม

- Peptone from casein	10.0	กรัม
- Meat extract	1.0	กรัม
- D-mannitol	10.0	กรัม
- Sodium chloride	10.0	กรัม
- phenol red	0.025	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.9 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 6.9 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ส่วนผสมเพิ่มเติม

ก. Egg-yolk emulsion

วิธีเตรียม

แช่ไข่ไก่ในสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% แยกไข่แดงออกจากไข่ขาวโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ผสมไข่แดงกับน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร ทำผสมให้เข้ากันดีด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อ

ข. Polymyxin B sulfate 0.1%

วิธีเตรียม

ละลาย Polymyxin B sulfate 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านแผ่นเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมครอน

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อครบสูตร

เติม Egg-yolk emulsion (ก) 10 มิลลิลิตร และสารละลาย Polymyxin (ข) 1 มิลลิลิตรใน ส่วนผสมพื้นฐาน (ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทใส่จานเพาะเชื้อ

10.10.1.4 Nitrate Detection reagents

A Sulfanilic acid reagent

- Sulfanilic acid	1.0	กรัม
- 5 N acetic acid	125.0	มิลลิลิตร

B N(1-napHtyl) ethylenediamine reagent

- N(1-napHtyl) ethylenediamine dihydrochloride 0.25 กรัม
- 5 N acetic acid 200.0 มิลลิลิตร

C alpHa – NapHthyl reagent

- alpHa – NapHthy 1.0 กรัม
- 5 N acetic acid 200.0 มิลลิลิตร

เตรียม 5 N acetic acid

เติม glacial acetic acid 28.75 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 71.25 มิลลิลิตร

การทดสอบ

เติม 0.1- 0.5 มิลลิลิตร ของ reagent A และ B จะให้ผลสีม่วง (ผลบวก)

เติม 0.1 – 0.5 มิลลิลิตร ของ reagent A และ C จะให้ผลสีส้ม (ผลบวก)

ถ้าไม่มีสี(ผลลบ)เติม Zinc dust ลงไป ถ้าได้สีกลับคืนมาแสดงว่าเป็นผลบวก ถ้าไม่มีสีเหมือนเดิม เป็นผลลบ

10.10.1.5 Tryticase Soy Polymyxin Broth

ส่วนผสม

- Trypticase peptone 17.0 กรัม
- Phytone peptone 3.0 กรัม
- Sodium chloride 5.0 กรัม
- Dipotassium phosphate 2.5 กรัม
- Dextrose 2.5 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 7.2 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับpHเป็น 7.2 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำบรรจุใส่หลอดแก้วขนาด 15 x 150 มิลลิลิตร หลอดละ 15 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนใช้ ให้เติม Polymyxin B 0.15% ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ต่อ 1 หลอดหรือต่อ 15 มิลลิลิตร

10.10.1.6 Tryticase Soy – Sheep Blood Agar

ส่วนผสม

- Tryptone หรือ Trypticase 17.0 กรัม
- Peptone 3.0 กรัม
- Dipotassium hydrogen phosphate 2.5 กรัม

- Sodium chloride	5.0	กรัม
- Glucose	2.5	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- เลือดคน หรือเลือดกระต่าย	70.0	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.3 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.3 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เติมเลือดคน หรือ เลือดกระต่าย 70 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเทใส่จานเพาะเชื้อ

10.10.1.7 Tryticase soy – sheep blood agar

ส่วนผสม

- Trypticase peptone	15.00	กรัม
- Phytone peptone	5.00	กรัม
- Sodium chloride	5.00	กรัม
- Distilled water	1.00	มิลลิลิตร

pH 7.3 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 – 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) จนมีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เติม Defibrinated sheep blood 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทใส่จานเพาะเชื้อ

10.10.2 วิธีการตรวจวิเคราะห์ *B. cereus* ในอาหาร

การตรวจหา *B. cereus* ในอาหารนั้นอาจตรวจหาเชิงคุณภาพ ซึ่งหมายถึงการตรวจสอบว่ามีแบคทีเรียชนิดนี้ในตัวอย่างอาหารหรือไม่ หรือตรวจหาเชิงปริมาณซึ่งหมายถึงการนับจำนวนเชื้อในตัวอย่างก็ได้

1. การตรวจหาเชิงคุณภาพ (Qualitative determination)

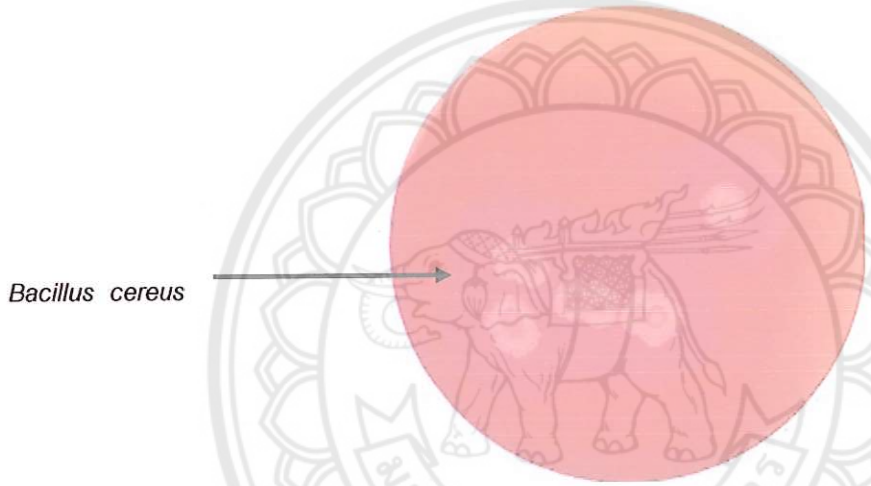
การตรวจสอบเชิงคุณภาพมักกระทำเมื่อมี *B. cereus* ปริมาณน้อยในตัวอย่าง ดังนั้นขั้นแรกจึงต้องทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ *B. cereus* ในตัวอย่างก่อน อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวดังกล่าวเรียกว่า อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือก (Selective enrichment broth) ซึ่งมักมีส่วนประกอบที่ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นแต่ *B. cereus* เจริญได้ดี ซึ่งได้แก่ Trypticase Soy Polymyxin Broth อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะมีส่วนผสมของ polymyxin ที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกส่วนใหญ่ได้ แต่ *B. cereus* สามารถทนได้ จากนั้นจึงเพาะแยกเชื้อบนอาหารแข็งสำหรับคัดเลือก *B. cereus* ซึ่งได้แก่ Mannitol Egg-Yolk Phenol Red Polymyxin agar (MEPPA) ซึ่งมีแมนนิทอล ไข่แดง และ polymyxin เป็นส่วนผสมสำคัญ และมีฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ของการเปลี่ยนแปลงค่า pH นอกจากนั้นยังอาจเพาะแยกเชื้อบน Polymyxin Pyruvate Egg-Yolk Mannitol Bromthymol Blue Agar (PPEMBA) ซึ่งมีแมนนิทอล ไข่แดง และ polymyxin เป็นส่วนผสมเช่นเดียวกัน แต่มีบรอมไธมอลบลูเป็นอินดิเคเตอร์ของการเปลี่ยนแปลงค่า pH (ศิริโฉม, 2543) หรืออาจใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Egg Yolk Polymyxine Agar (MYP agar) ก็ได้ ซึ่งโคโลนีของ *B. cereus* จะมีสีแดงเนื่องจากไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาล mannitol ได้ (Downes and ITO, 2001) เมื่อ *B. cereus* เจริญบนอาหารทั้งสองชนิดจะให้โคโลนีลักษณะเฉพาะ ดังตาราง 10.2 และภาพ 10.1

2. การตรวจหาเชิงปริมาณ (Quantitative determination)

ในกรณีที่ต้องการนับจำนวน *B. cereus* ในอาหารจะละเว้นขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนเชื้อดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดคัดเลือก แต่จะนำตัวอย่างมาทำการเจือจางด้วยสารละลายเจือจาง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นจึงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิดคัดเลือกโดยตรง แล้วนับจำนวนโคโลนีลักษณะเฉพาะที่ให้ผลการทดสอบเพิ่มเติมของ *B. cereus*

ตารางที่ 10.2 ลักษณะโคโลนีของ *B. cereus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือกบางชนิด

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
Mannitol Egg-Yolk Phenol Red Polymyxin Agar (MEPPA)	กลม แบน แห้ง ผิวหยาบ สีขาวครีม มีวงขุ่นรอบโคโลนี เนื่องจากเอนไซม์เลซิทิเนสที่แบคทีเรียผลิตขึ้นย่อยสลายเลซิทินในไข่แดง และอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีแดงเนื่องจากแบคทีเรียไม่หมักแมนนิทอล
Polymyxin Pyruvate Egg-Yolk Mannitol Bromthymol Blue Agar (PPEMBA)	กลม แบน แห้ง ผิวหยาบ สีเขียวอมฟ้า หรือน้ำเงินอมเขียว มีวงขุ่นรอบโคโลนี



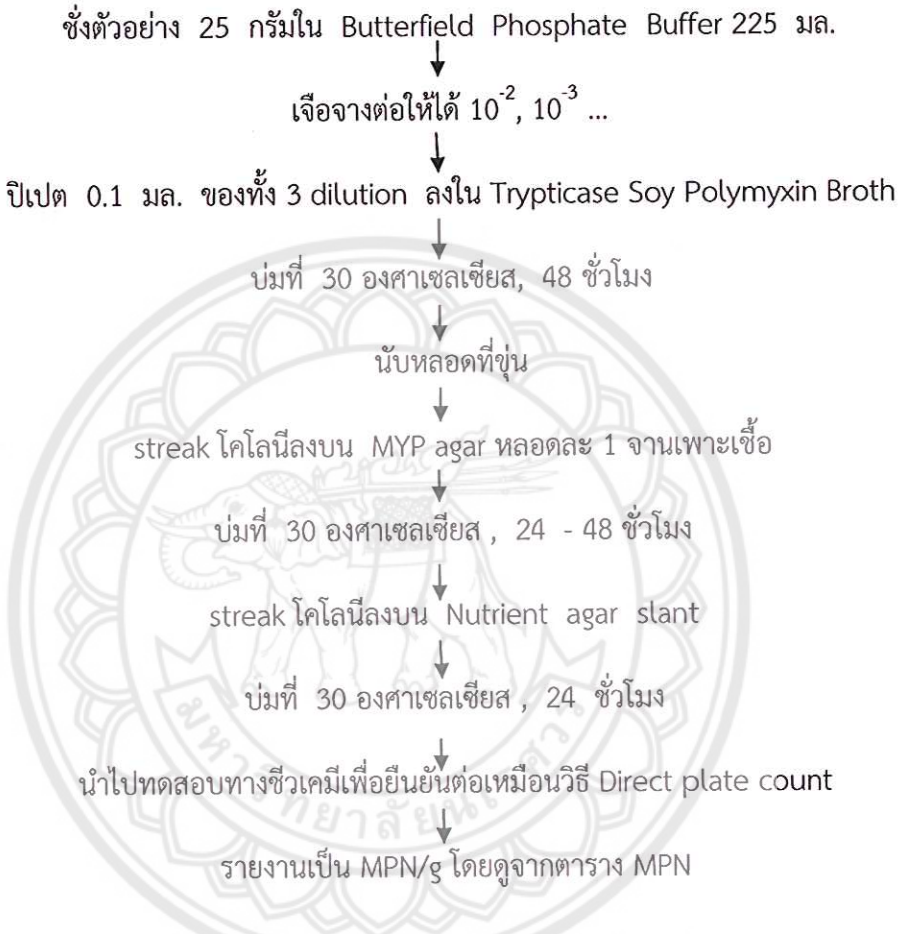
ภาพ 10.1 ลักษณะโคโลนีของ *B. cereus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดคัดเลือก MYP agar

ที่มา : Merck Manual 12th ed, (2010).

เมื่อพบโคโลนีลักษณะเฉพาะดังกล่าว ควรเลือกทดสอบสมบัติของเชื้อเพิ่มเติม (ตารางที่ 10.2) เพื่อแยก *B. cereus* จาก Bacillus ชนิดอื่น ๆ ที่ให้ลักษณะโคโลนีคล้ายกันด้วย

1. การตรวจวิเคราะห์ *B. cereus* โดยวิธี MPN (Most probable number)

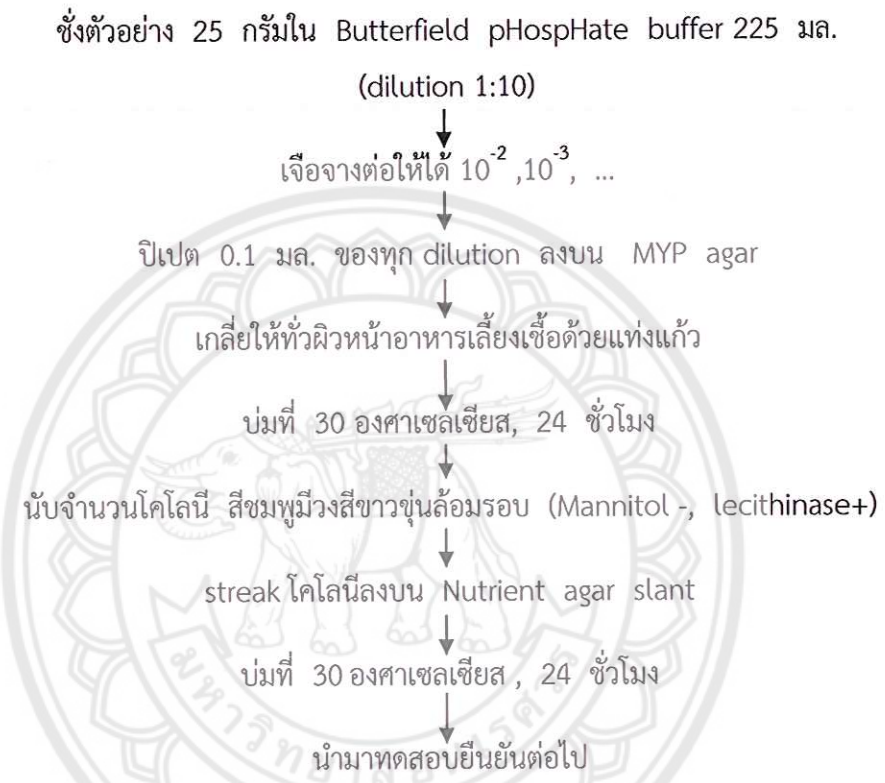
การตรวจวิเคราะห์ *B. cereus* โดยวิธี MPN (Most probable number) ใช้นับจำนวนเซลล์ในอาหารที่คาดว่าจะมี ***B. cereus*** อยู่น้อยกว่า 10 เซลล์/กรัม หรือใช้วิเคราะห์อาหารพวก dehydrated starch วิธีวิเคราะห์แสดงดังภาพ 10.2



ภาพ 10.2 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *B. cereus* โดยวิธีเอ็มพีเอ็น

1. วิธีวิเคราะห์ *B. cereus* โดยวิธี Direct Plate Count

การเตรียมตัวอย่าง นำตัวอย่างมาตรวจทันที ถ้าไม่ได้ให้เก็บตัวอย่างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ภายใน 4 วัน ให้แช่แข็งไว้ที่ – 20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการตรวจตัวอย่างให้นำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างอาหารแห้งให้เก็บที่อุณหภูมิห้องและขนส่งตัวอย่างโดยไม่ต้องแช่เย็น วิธีวิเคราะห์ *B. cereus* ด้วยวิธี Direct plate Count แสดงดังภาพ 10.3



ภาพ 10.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ *B. cereus* โดยวิธี Direct plate count

วิธีการทดสอบยืนยัน *B. cereus*

1. Gram stain (การย้อมแกรม)

1.1 นำโคโลนีมาทำการย้อมแกรม

1.2 ตรวจดูการติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลของ *B. cereus* แกรมบวก รูปท่อน มีสปอร์ภายในเซลล์ เซลล์โป่งพอง

2. Motility Test : โดยวิธี Slide test

2.1 บ่มเชื้อใน nutrient agar ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 6 - 8 ชั่วโมง

2.2 แตะเชื้อบนสไลด์แล้วหยดน้ำลงไป ผสมให้ทั่ว ปิดด้วย cover slip

2.3 แล้วนำไปตรวจดูการเคลื่อนที่ของเซลล์ในน้ำด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลของ *B. cereus* (+)

3. Nitrate reduction :

3.1 เพาะเชื้อในอาหาร Nitrate broth

บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 การทดสอบ

เติม 0.1 – 0.5 มิลลิลิตร ของ reagent A และ B จะให้ผลสีม่วง (ผลบวก)

เติม 0.1 - 0.5 มิลลิลิตร ของ reagent A และ C จะให้ผลสีส้ม (ผลบวก)

ถ้าไม่มีสี(ผลลบ)ให้เติม Zinc dust ลงไป ถ้าได้สีกลับคืนมาแสดงว่าเป็นผลบวก ถ้าไม่มีสี

เหมือนเดิม เป็นผลลบ

ผลของ *B. cereus* (+), สีส้ม

4. Hemolytic activity (การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง)

4.1 เพาะเชื้อโดยการขีดตรง ๆ ลงบนจานอาหาร blood agar

4.2 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลของ *B. cereus* เกิดรอยใสรอบการเจริญของเชื้อ (ผลบวก)

5. การผลิตผลึกสารพิษ

5.1 เพาะโคโลนีบนหลอดอาหารเอียง nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำออกมาบ่มที่อุณหภูมิห้องอีกเป็นเวลา 2 - 3 วัน เพื่อทำให้เซลล์ที่มีสปอร์แตกออก

5.2 เกลี่ยเชื้อบนสไลด์ ทำให้แห้งในอากาศ และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน

5.3 ตรึงเซลล์ด้วยสารละลายเมทานอลเป็นเวลา 30 นาที เททิ้ง จากนั้นทำให้แห้งโดยการนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ

5.4 ย้อมด้วยสารละลาย basic fuchin นำไปอุ่นด้วยความร้อนจนเกิดควัน เป็นเวลา 30 วินาที จึงเทสารละลายดังกล่าวออก จากนั้นจึงนำไปล้าง ด้วยน้ำประปา แล้วปล่อยให้แห้งในอากาศ

5.5 ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้ามีผลึกสารพิษอยู่จะเห็นเป็นรูปสี่เหลี่ยมติดสีเข้ม

ผลของ *B. cereus* ไม่พบผลึกสารพิษ (ผลลบ)

6. การเจริญแผ่คล้ายรากไม้ rhizoidal growth

6.1 เพาะเชื้อ 1 จุด ลงบนจานอาหาร nutrient agar (ผึ่งให้ผิวหน้าอาหารแห้งก่อน)

6.2 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

ผลของ *B. cereus* โคโลนีไม่แผ่ออกคล้ายรากไม้ หรือเส้นผม (ผลลบ)

ปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ ของ *B. cereus* เทียบกับ Baciilus อื่น แสดงดังตาราง 10.3

การรายงานผล การตรวจวิเคราะห์ *B. cereus* รายงานเป็น CFU/g

จำนวนโคโลนี/กรัมของอาหาร = A x C/B x D x 10

A = จำนวนโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดเฉลี่ยต่อ 1 เพลท

B = จำนวนโคโลนีที่เลือกมาทดสอบ

C = จำนวนโคโลนีที่ให้ผลถูกต้อง

D = Dilution factor เช่น เลือกเพลทของ dilution 10^{-3}, D = 10^{3}

X 10 หมายถึง ตัวอย่างเริ่มต้นเจือจางที่ 1 : 10

ตาราง 10.3 ปฏิกิริยาทางชีวเคมีของ *B. cereus* เทียบกับ *Bacillus* อื่น

Feature	*B. cereus*	*B. thuringiensis*	*B. mycoides*	*B. weihenstephanensis*	*B. anthracis*	*B. megaterium*
Gram reaction	+[a]	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Motility	+/ -[b]	+/-	-[c]	+	-	+/-
Reduction of nitrate	+	+	+	+	+	-[d]
Tyrosine decomposed	+	+	+/-	+	-[d]	+/-
Lysozyme-resistant	+	+	+	+	+	-
Egg yolk reaction	+	+	+	+	+	-
Anaerobic utilization of glucose	+	+	+	+	+	-
VP reaction	+	+	+	+	+	-
Acid produced from mannitol	-	-	-	-	-	+
Hemolysis (Sheep RBC)	+	+	+	ND	-[d]	-
Known pathogenicity[e] /characteristic	produces enterotoxins	endotoxin crystals pathogenic to insects	rhizoidal growth	growth at 6°C; no growth at 43°C	pathogenic to animals and humans	

[a] +, 90-100% of strains are positive. ,[b] +/-, 50-50% of strains are positive.

[c] -, 90-100% of strains are negative. ,[d] -, Most strains are negative.

[e] See Section H, Limitations of method for *B. cereus*.

ND Not determined

ที่มา; Tallent, et al. (2002)

บทปฏิบัติการที่ 11
การตรวจวิเคราะห์ *Yersinia enterocolitica* ในอาหาร

11.1 ความมุ่งหมาย (Purpose)

เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์ *Yersinia enterocolitica* ในอาหาร

11.2 การใช้งาน (Application)

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์ *Yersinia enterocolitica* ในอาหาร

11.3 เอกสารอ้างอิง (References)

11.3.1 สิริพร สธนเสาวภาคย์. (2541). **จุลินทรีย์ในอาหารแช่เย็นและแช่เยือกแข็ง.** เอกสารของสถาบันของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาอาหาร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 17 หน้า.

11.3.2 บุญส่ง แสงอ่อน. (2547). **คู่มือจุลชีววิทยาทางอาหารภาคปฏิบัติการ. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม,** มหาวิทยาลัยนเรศวร. 75 หน้า

11.3.3 AOAC. (1995). **Official Methods of Analysis of Association of Official** Analytical Chemists. 6th ed. Associations of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.

11.3.4 Downes, F.P. and ITO, K. (2001). **Compendium of Methods for the** Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

11.3.5 Cox, N. A., Corral, F. D., Bailey, J. S., Shotts, E. B. and Papa, C. **M. (1990).** The presence of *Yersinia enterocolitica* and Other *Yersinia* species on the carcasses of market broilers. Poult. Sci. 69 (3): 482-485.

11.3.7 Fukushima, H., Hoshina K., Itagawa, H. and Gomyoda, M. (1997). **Introduction into Japan of pathogenic *Yersinia* through imported pork, beef and foul.** Int. J. Food Microbiol. 35:205-212

11.3.6 Stojanka, A., and Bockemuhl ,J. (1999). Chapter 30: *Yersinia* and Other Enterobacteriaceae. In Manual of clinical microbiology. 7th ed. American society for microbiology. p.483-496

11.3.5 Weagant S. D., Feng P. and Stanfield, J.T. (2001) Chapter 8: ***Yersinia entercolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In** Bacteriological Analytical Manual Online. สืบค้นจาก :

http://www.fda. gov/Food/Science Research/ Laboratory Methods/Bacteriological Analytical Manual BAM/ucm064948.htm เมื่อวันที่ 21 มกราคม 2556

11.4 นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

11.4.1 CIN agar = Celfsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar

11.4.2 TSAYE = Trypticase (tryptic) Soy Agar With Yeast Extract

11.4.3 LAIA = Lysine Arginine Iron Agar

11.4.4 CRBHO = Congo Red-Brain Heart Infusion Agarose

10.5 หลักการทางวิทยาศาสตร์ (principle)

Yersinia enterocolitica

Yersinia enterocolitica ทำให้เกิดโรค Yersiniosis เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ที่อุณหภูมิ 22–30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เคลื่อนที่ที่ 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ สามารถตรวจพบได้ทั่วโลก มีรายงานการตรวจพบมากในอเมริกา ยุโรป ออสเตรเลีย และเอเชียตอนเหนือ (Cox et al., 1990; Floccari et al., 2000) สามารถตรวจพบเชื้อได้ในมนุษย์ อาหาร สัตว์ ดังเช่น ไก่ สัตว์ปีก วัว สุกร และ แกะ พบว่าสุกรเป็นพาหะของเชื้อที่สำคัญที่นำเชื้อมาสู่มนุษย์ การติดเชื้อได้โดยการบริโภคอาหาร หรือน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ อาการที่พบได้ในเด็กโต และผู้ใหญ่ คือมีไข้ และปวดท้องด้านขวา ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วย หรือแพทย์ อาจจะสับสนกับอาการปวดท้องเนื่องจากไส้ติ่งอักเสบได้ อาการแทรกซ้อนอื่น ที่สามารถพบได้แก่ ผื่นที่ผิวหนัง ปวดข้อหลังติดเชื้อ และพบว่าบางครั้งเชื้อได้แพร่เข้าสู่กระแสเลือด ในเด็กเล็กส่วนใหญ่มีไข้ ปวดท้อง และท้องเสีย บางครั้งอาจถ่ายเป็นเลือด ขณะเดียวกันได้รายงานการตรวจพบเชื้อนี้ใน ผลิตภัณฑ์นม ไอศกรีม เนื้อดิบ และเนื้อที่ปรุงสุก (Stojanka and Bockemuhl,1999) เชื้อนี้ได้มีรายงานว่าพบในเนื้อไก่ส่งออกจากประเทศไทยไปยังญี่ปุ่นจึงทำให้ถูกกีดกันมิให้นำเข้าในญี่ปุ่น (Fukushima et al.,1997) แต่สำหรับประเทศไทยยังไม่มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Y. enterocolitica* ในผู้ป่วย อาหาร สัตว์ อาจเนื่องมาจากยังไม่มีผู้ให้ความสนใจมากนักทำให้ผลงานวิจัยในประเทศไทยมีน้อยมาก

11.6 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

-

11.7 ความปลอดภัย (Safety)

11.7.1 ต้องสวมเสื้อคลุมตลอดระยะเวลาปฏิบัติการเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ติดผิวหนังหรือเสื้อผ้า รวมทั้งป้องกันตัวเองและเสื้อผ้าจากการกระเด็นของสารเคมีและสิ่งสกปรกต่างๆ

11.7.2 ห้ามรับประทานอาหาร ดื่มหรือสูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนห้ามเคี้ยว หรือกัดดินสอ ปากกา

11.7.3 หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับหน้าหรือตาระหว่างปฏิบัติงาน

11.7.4 ก่อนและหลังปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อความสะอาดบริเวณปฏิบัติงานทุกครั้ง

11.7.5 ต้องติดฉลาก แสดง ชื่อ วันที่ ตัวอย่าง ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อหรืออื่นๆ ลงบน จานเพาะเชื้อหรืออุปกรณ์ ทดลองเพื่อป้องกันการล้างหรือนำไปทิ้งโดยไม่ตั้งใจ

11.7.6 ใช้ตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์ด้วยความระมัดระวัง ห้ามวางตะเกียงดังกล่าวไว้ใกล้ภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์หรือสารไวไฟต่างๆ รวมทั้งระมัดระวังมือและเส้นผม หรือส่วนต่างๆ ของร่างกายจากการถูกไฟลวก ดับตะเกียงทุกครั้งเมื่อเลิกใช้งาน

11.7.7 วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม จานเพาะเชื้อหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปล้าง

11.7.8 สไลด์ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปกำจัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

11.7.9 ก่อนและหลังปฏิบัติการทุกครั้งต้องล้างมือด้วยสบู่ และเช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์) ทุกครั้ง

11.8 เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and supplies)

11.8.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 4 , 26 และ 37องศาเซลเซียส

11.8.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

11.8.3 เครื่องวัด pH (pH meter)

11.8.4 เครื่องชั่ง (Balance)

11.8.5 เครื่องแก้ว ได้แก่ Petri dish, Pipette, dilution bottle, glass rod spreader

11.8.6 ตู้บ่มเชื้อคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 Incubator หรือ anaerobic jar)

11.8.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

11.8.8 กรรไกรปลอดเชื้อ

11.8.9 เครื่องตีป่น (Stomacher)

11.8.10 ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (Stomacher bag)

11.8.11 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

11.8.12 น้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับเช็ดโต๊ะปฏิบัติการ

11.9 สารมาตรฐาน (Standard)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

11.9.1 Peptone Sorbitol Bile Broth (PSBB)

11.9.2 MacConkey Agar

11.9.3 Celfsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) Agar

11.9.4 Bromcresol Purple Bbroth

11.9.5 Christensen's Urea Agar

11.9.6 Motility test medium (เติม 1% 2,3,5-triphenyl tetrazolium)

11.9.7 Tryptone Broth, 1%

11.9.8 MR-VP Broth

11.9.9 Simmons Citrate Agar

11.9.10 Veal Infusion Broth

11.9.11 Bile Esculin Agar

11.9.12 Trypticase (tryptic) Soy Aar with Yeast Extract (TSAYE)

11.9.13 Lysine Arginine Iron Agar (LAIA)

11.9.14 Congo Red BHI Aagarose (CRBHO)

11.10 วิธีดำเนินการ (Procedures)

11.10.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

11.10.1.1 Peptone Sorbitol Bile Broth

<u>ส่วนผสม</u>

- Na_2HPO_4	8.23	กรัม
- $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1.2	กรัม
- Bile salts	1.5	กรัม
- NaCl	5.0	กรัม
- Sorbitol	10	กรัม
- Peptone	5.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.6 ± 0.2

<u>วิธีการเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ปรับ pH เป็น 7.6 แบ่งใส่ขวดละ 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

11.10.1.2 MacConkey Agar

ส่วนผสม

- Proteose peptone or polypeptone	3.0	กรัม
- Peptone or gelysate	17.0	กรัม
- Lactose	10.0	กรัม
- Bile salts	1.5	กรัม
- NaCl	5.0	กรัม
- Sorbitol	10.0	กรัม
- Peptone	5.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.6 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ปรับ pH เป็น 7.6 แบ่งใส่ขวดละ 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อ 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

11.10.1.3 Celfsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) Agar

ส่วนผสม

สาร A Basal medium

- Peptone	20.0	กรัม
- Yeast extract	2.0	กรัม
- Mannitol	20.0	กรัม
- Pyruvic acid (Na salt)	2.0	กรัม
- NaCl	1.0	กรัม
- $MgSO_4.7H_2O$ (10 mg/ml)	1.0	มิลลิลิตร
- Agar	12.0	กรัม
- น้ำกลั่น	756.0	มิลลิตร

สาร B Irgasan (Ciba-Geigy) solution

- ละลาย Irgasan 0.40% ใน 95% ethanol 1 มิลลิลิตร
  (เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เก็บได้นาน 4 สัปดาห์)

สาร C Desoxycholate solution

- Sodium desoxycholate 0.5 กรัม
- น้ำกลั่น 200.0 มิลลิลิตร

(ต้มจนสารละลาย ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส.

สาร D Sodium hydroxide, [5 N] 1 มิลลิลิตร

สาร E Neutral red, [3 mg/ml] 10 มิลลิลิตร

สาร F Crystal violet, [0.1 mg/ml] 10 มิลลิลิตร

สาร G Cefsulodin (Abbott Labs), [1.5 mg/ml] 10 มิลลิลิตร

สาร H Novobiocin, [0.25 mg/ml] 10 มิลลิลิตร

สาร I Strontium chloride, [10%; filter-sterilized] 10 มิลลิลิตร

เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ทิ้งให้น้ำแข็งละลายที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการเตรียม

ต้มให้ส่วนผสม A ทั้งหมดละลาย ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย B ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย C, D, E, H และ I ตามลำดับ คนให้เข้ากันช้าๆ ปรับ pH 7.4 ด้วย 5 N NaOH ควบคุมอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อ 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

11.10.1.4 Bromcresol Purple Broth

ส่วนผสม

- Peptone 10.0 กรัม
- Beef extract 3.0 กรัม
- NaCl 5.0 กรัม
- Bromcresol purple 0.04 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 7.6 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.2 เติม Bromcresol purple (ละลายในแอลกอฮอล์ 95%) ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 X 100 มิลลิลิตร หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร และใส่ Durham tube 1 หลอด(คว่ำหลอด) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติมน้ำตาลที่ต้องการทดสอบ (carbohydrate) ลงไป 1 เปอร์เซ็นต์ sterile โดยวิธีกรองผ่าน membrane filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน หรืออาจ sterile โดยใช้ autoclave ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

11.10.1.5 Christensen's Urea Agar

ส่วนผสม

-	Peptone	1.0	กรัม
-	NaCl	5.0	กรัม
-	Dextrose	1.0	กรัม
-	KH_2PO_4	2.0	กรัม
-	Phenol red	0.012	กรัม
-	Agar	15.0	กรัม
-	น้ำกลั่น	900.0	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ปรับ pH ให้เป็น 6.9 เตรียม agar ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร แล้ว sterile โดยใช้ autoclave นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สำหรับส่วนประกอบอื่นๆ ให้ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้ว sterile โดยการกรองผ่าน membrane filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน นำ urea base นี้ไปเติมใน agar ที่ปล่อยให้เย็นอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอดทดลอง หรือ จานเพาะเชื้อ

11.10.1.6 Motility Test Medium (Semisolid)

ส่วนผสม

-	Beef extract	3.0	กรัม
-	Peptone or gelysate	10.0	กรัม
-	NaCl	5.0	กรัม
-	Agar	4.0	กรัม
-	น้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมด ปรับ pH เป็น 7.4 แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 8 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

11.10.1.7 MR-VP Test

ส่วนผสม

-	Peptone from meat	7.0	กรัม
-	D(+)Glucose	5.0	กรัม
-	Phosphate buffer	5.0	กรัม
-	น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.9 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับpHเป็น 6.9 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

11.10.1.8 Tryptone Water 1%

ส่วนผสม

- Peptone from casein	10.0	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0 + 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

11.10.1.9 Simmons' Citrate Agar

ส่วนผสม

- Ammonium dihydrogen phosphate	1.0	กรัม
- di-Potassium hydrogen phosphate	1.0	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- Sodium citrate	2.0	กรัม
- Magnesium sulfate	0.2	กรัม
- Bromthymol blue	0.08	กรัม
- Agar	13.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.8 + 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 6.8 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางหลอดในลักษณะวุ้นเอียง

11.10.1.10 Veal Infusion Agar and Broth

ส่วนผสม

-	Proteose peptone No. 3	10.0	กรัม
-	NaCl	5.0	กรัม
-	Agar	15.0	กรัม
-	น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.3 + 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 7.3 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 7 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางในลักษณะวุ้นเอียง

11.10.1.11 Bile Esculin Agar

ส่วนผสม

-	Beef extract	3.0	กรัม
-	Peptone	5.0	กรัม
-	Esculin	1.0	กรัม
-	Oxgall	4.0	กรัม
-	Ferric citrate	0.5	กรัม
-	Agar	15.0	กรัม
-	น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.6 + 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับ pH เป็น 6.6 ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121องศาเซลเซียส นาน15 นาที ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45 - 50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อ 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

10.1.1.12 Trypticase (tryptic) Soy Agar With Yeast Extract (TSAYE)

ส่วนผสม

-	Trypticase soy agar	40.0	กรัม
-	Yeast extract	6.0	กรัม
-	น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.3 + 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 7.3 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางในลักษณะวุ้นเอียง

11.10.1.13 Lysine Arginine Iron Agar (LAIA)

ส่วนผสม

-	Peptone	5.0	กรัม
-	Yeast extract	3.0	กรัม
-	Glucose	1.0	กรัม
-	L-Lysine	10.0	กรัม
-	L-Arginine	10.0	กรัม
-	Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
-	Sodium thiosulfate	0.04	กรัม
-	Bromcresol purple	0.02	กรัม
-	Agar	15.0	กรัม
-	น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.3 + 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.3 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุหลอดแก้วขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วางในลักษณะวุ้นเอียง

11.10.1.14 Congo Red BHI Agarose (CRBHO) Medium*

ส่วนผสม

-	Brain heart infusion (M201)	37.0	กรัม
-	$MgCl_2$	1.0	กรัม
-	Agarose	12.0	กรัม
-	Congo Red dye (375 mg/ในน้ำกลั่น100 ml)	20.0	มิลลิลิตร
-	Agar	15.0	กรัม
-	น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.3 + 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับ pH เป็น 6.6 ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน15 นาที ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อ 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

11.10.2 วิธีการตรวจวิเคราะห์ *Y. enterocolitica* ในอาหาร

วิธีการ

1. Enrichment

1.1 วิเคราะห์ตัวอย่างทันทีหลังจากได้รับตัวอย่างแล้ว ถ้าจำเป็นให้แช่ตัวอย่างในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่ห้ามนำไปแช่เยือกแข็ง

1.2 ดูดตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 90 มิลลิลิตร หรือ ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ใส่ถุงปลอดเชื้อ เติม 225 มิลลิลิตร ของอาหารเหลว PSBB ตีป่น 30 วินาที

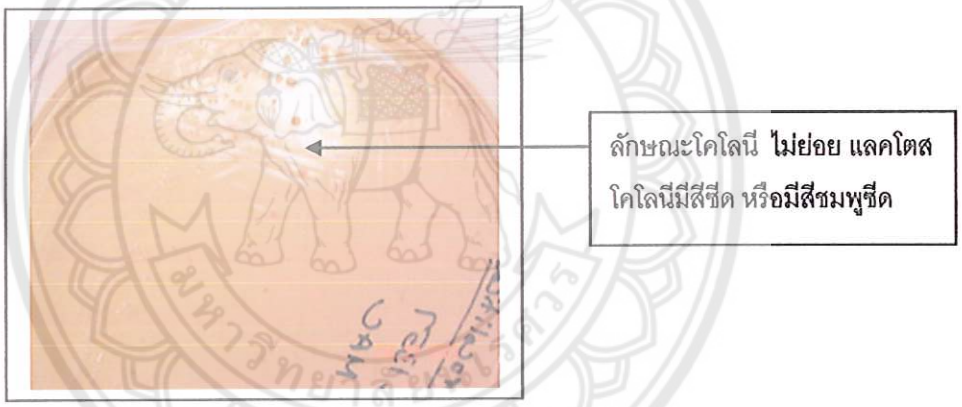
1.3 บ่มพาะเชื้อที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน เพื่อทำ cold enrichment

2. Isolation

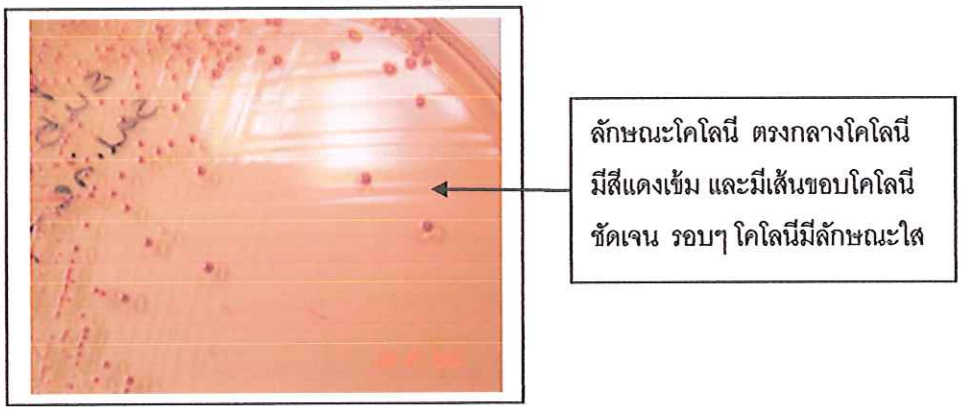
2.1 ใช้ loop แตะเชื้อจากอาหาร enrichment มา streak ลงบน MacConkey agar, CIN (YSA)

2.2 บ่มจานเพาะเชื้อ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.3 ลักษณะโคโลนี *Y. enterocolitica* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar แสดงดังภาพ 11.1 และ YSA (CIN) ภาพ 11.2



11.1 ลักษณะโคโลนี *Y. enterocolitica* บน MacConkey Agar



ภาพ 11.2 ลักษณะโคโลนี *Y. enterocolitica* บน YSA (CIN)

3. ทดสอบทางชีวเคมี ลักษณะทางชีวเคมีของ *Y. enterocolitica* แสดงดังตาราง 11.1

ตาราง 11.1 ลักษณะทางชีวเคมีของ *Y. enterocolitica*

Reaction	*Y. enterocolitica*
Lysine	-
Arginine	-
Ornithine	+[c]
Motility 22-26 ^{0}C	+
Motility 35-37 ^{0}C	-
Urea	+
Phenylalanine deaminase	-
Mannitol	+
Sorbitol	+
Cellobiose	+
Adonitol	-
Inositol	+/-(+)
Sucrose	+[c]
Rhamnose	-
Raffinose	-
Melibiose	-
Simmons citrate	-
Voges- Proskauer	+/-(+)
Indole	+/-
Salicin	+/-
Esculin	+/-
Lipase	+/-
Pyrazinamidase	+/-

[a] + = positive after 3 days at RT, (+) = positive after 7 days at RT.

[c] Some biotype 5 strains are negative.

ที่มา: BAM online. (2001)

วิธีทดสอบทางชีวเคมี

เขี่ยเชื้อต้องสงสัยและจากเชื้อบริสุทธิ์ ปลูกลงในอาหารเพื่อคุณสมบัติของเชื้อในอาหารต่อไปนี้

3.1 Streak เชื้อบนอาหาร CIN agar อธิบายลักษณะโคโลนีที่พบ

3.1.1 บ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

ผลของ *Y. enterocolitica* ตรงกลางโคโลนีมีสีแดงเข้ม และมีเส้นขอบโคโลนีชัดเจน รอบๆ โคโลนีมีลักษณะใส

3.2 LAIA Slant (K A – -)

3.2.1 เพาะโคโลนีลงในอาหารเอียง LAIA Slant โดยขีดลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ แทงลงไปจนถึงก้นหลอด , Streak เชื้อบนอาหาร Christensen's Agar Plate หรือ Bile Esculin Agar

3.2.2 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลของ *Y. enterocolitica* แสดงดังภาพ 11.3, 11.4, 11.5

3.3 ทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility) ที่อุณหภูมิ 26 และ 37 องศาเซลเซียส

3.3.1 เพาะโคโลนีลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Motility test medium (semisolid) with TTC

3.3.2 บ่มเพาะเชื้อที่ 22-26 องศาเซลเซียส และ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.3 ดูการเคลื่อนที่ของเชื้อที่อุณหภูมิ 22-26 องศาเซลเซียส และ 35-37 องศาเซลเซียส

ผลของ *Y. enterocolitica* มีการเคลื่อนที่ ที่ 22-26 องศาเซลเซียส แต่ไม่มีการเคลื่อนที่ที่ 35- 37 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพ 11.6

3.4 การทดสอบอินโดล Methyl red (positive)

3.4.1 เพาะโคโลนีลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ 1% typtone broth

3.4.2 บ่มจานเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.3 เติมสารละลายโคแวคส์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอด เขย่าเบา ๆ

ผลของ *Y. enterocolitica* เกิดชั้นสีแดงด้านบนของชั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ (ผลบวก)

3.5 Sucrose (unusually positive)

3.5.1 เพาะโคโลนีลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Bromcresol purple broth

3.5.2 บ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.3 ดูการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลของ *Y. enterocolitica* อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ผลบวก)

3.6 Voges Proskauer (unusually positive) การทดสอบ Autoagglutination test ด้วยเอ็มอาร์ วีพี

3.6.1 เพาะโคโลนีลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRVP broth

3.6.2 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลของ *Y. enterocolitica* แสดงดังภาพ 11.7

3.7 Congo Red Assay เพื่อตรวจสอบ plasmid –CRMOA agar – Colony สีแดง การทดสอบ Low calcium response Congo Red agarose virulence test.

3.7.1 เพาะเชื้อในอาหาร BHI broth

3.7.2 บ่มเพาะเชื้อที่ 22-26 องศาเซลเซียส และ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.3 เจือจางเชื้อด้วยน้ำเกลือสเตอร์ไรส์ให้ได้ 1,000 เซลล์/มิลลิลิตร

3.7.4 ปิเปตมา 0.1 มิลลิลิตร สเปรดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CRBHO จำนวน 2 จานเพาะเชื้อ

3.7.5 บ่มเพาะเชื้อที่ 25 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

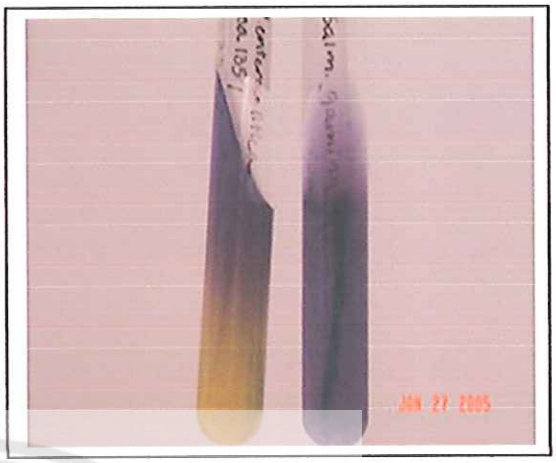
ผลของ *Y. enterocolitica* แสดงดังภาพที่ 11.8

ลักษณะของ *Y. enterocolitica* บนอาหารทดสอบชนิดต่างๆ

LAIA Slant

Y. enterocolitica (ซ้าย) = K A – -

Salmonella (ขวา) = K K A + -



ภาพ 11.3 ลักษณะโคโลนี *Y. enterocolitica* บน LAIA slant (ซ้าย)

Christensen's Urea agar

Y. enterocolitica = pink color(urease positive)

E. coli = no color (urease negative)

ภาพ 11.4 ลักษณะโคโลนี *Y. enterocolitica* บนอาหาร Christensen's Urea agar

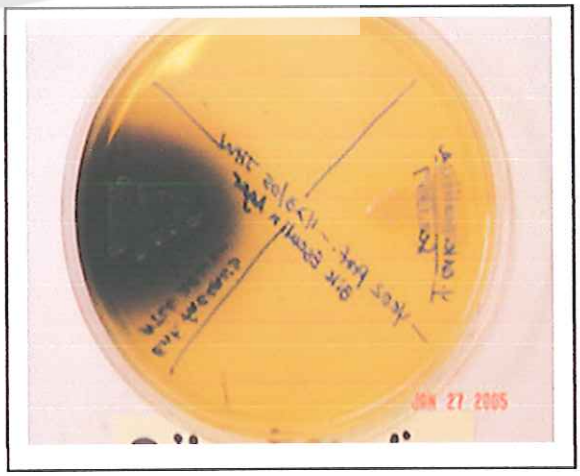
Bile Esculin agar

Y. enterocolitica (except biotype 1A)

= esculin ไม่เปลี่ยนเป็นสีดำสี

Ent. faecalis

= esculin เปลี่ยนเป็นสีดำ (black color)



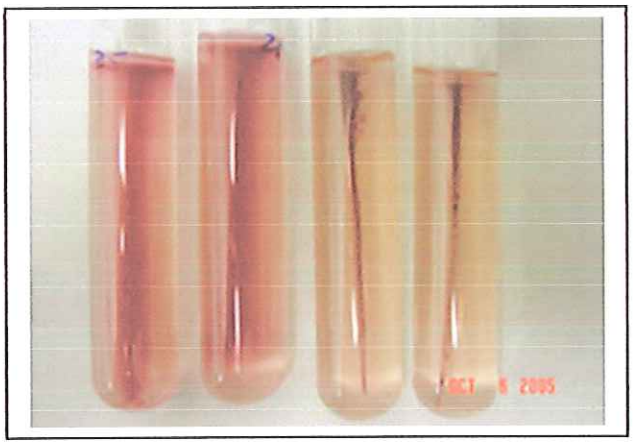
ภาพ 11.5 ลักษณะโคโลนี *Y. enterocolitica* บน Bile Esculin agar

Motility Test Medium with TTC

Y. enterocolitica

= เคลื่อนที่ๆ 25 องศาเซลเซียส
(2 หลอด ซ้าย)

= ไม่มีการเคลื่อนที่ 35 องศาเซลเซียส
(2 หลอด ขวา)



ภาพ 11.6 ลักษณะการเคลื่อนที่ *Y. enterocolitica* ในอาหาร Motility Test Medium with TTC

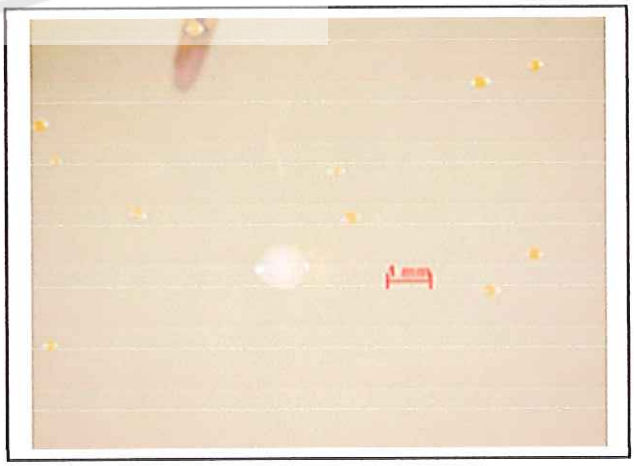
MRVP Agglutination Test

แสดงการเจริญของเชื้อในอาหาร MRVP broth
ที่ 25 องศาเซลเซียส
pathogenic *Y.* enterocolitica อาหารเลี้ยง
เชื้อขุ่นมีตะกอนตกอยู่ด้านล่าง (หลอดซ้าย)
ที่ 35 องศาเซลเซียส
เซลล์ตกตะกอนด้านล่างแต่อาหารเลี้ยงเชื้อ
ไม่ขุ่น และไม่มีการจับตัวข้างผนังหลอด(หลอดขวา)

ภาพ 11.7 ลักษณะการเจริญของ *Y. enterocolitica* ในอาหาร MRVR broth

Y. enterocolitica บน CRBHO ที่ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

Plasmid bearing *Y. enterocolitica*
โคโลนีมีสีแดง ทึบแสง และมีลักษณะนูน
Plasmidless โคโลนีมีขนาดใหญ่ แบน,
และโปร่งแสง



ภาพ 11.8 ลักษณะ Plasmid bearing ของ *Y. enterocolitica* บนอาหาร CRBHO

บทปฏิบัติการที่ 12
การตรวจวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร

12.1 ความมุ่งหมาย(Purpose)

เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์จำนวน การหาจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหาร

12.2 การใช้งาน (Application)

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหาร

12.3 เอกสารอ้างอิง (References)

12.3.1 บุญศรี จงเสรีจิตต์. (2542). คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาของอาหาร. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

12.3.2 เรณู ปิ่นทอง. (2537). คู่มือจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 284 หน้า.

12.3.3 ศิริโฉม ทุ่งเก้า. (2543). ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา. 158 หน้า.

12.3.4 AOAC. (1995). Official Methods of Analyses of Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Associations of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.

12.3.5 Downes, F. P and ITO, K. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

12.3.6 ICMSF. (1998). Microorganisms in Foods. Blackie Academic and Profession, London.

12.3.7 Roberts, D., Hooper, W. and Greenwood, W. (1995). Practical food Microbiology (Methods for the examination of food for micro-organism of public health significance, 2nd ed. Public health laboratory service. London. 232 p.

12.3.8 U. S. Food and Drug Administration. (1995). Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. AOAC International. Gaithersburg, MD.

12.4 นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

MRS agar = de Man, Rogosa, Sharp agar

12.5 หลักการทางวิทยาศาสตร์ (principle)

แบคทีเรียกรดแลคติก หมายถึง กลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจากการหมักคาร์โบไฮเดรต ซึ่งได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมหรือรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ส่วนใหญ่ไม่ผลิตเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ หรือต้องการปริมาณน้อยแบคทีเรียแลคติก ที่สำคัญได้แก่ *Lactobacillus, Lactococcus, Pediococcus* และ *Streptococcus* เป็นต้น อาจแบ่งแบคทีเรียแลคติกออกเป็น 2 กลุ่มย่อยตามชนิดของผลผลิตที่ได้จากการหมัก คือ กลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofementative) ได้แก่ พวกที่ผลิตกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่จากการหมักน้ำตาล ตัวอย่างของแบคทีเรียแลคติกกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus* ชนิดต่างๆ เช่น *Lb. bulgaricus, Lb. helveticus, Lb. casei, Lb. plantarum* เป็นต้น รวมทั้ง *Pediococcus, Streptococcus* และ *Lactococcus* ทุกชนิด สำหรับแบคทีเรียแลคติกอีกกลุ่มหนึ่ง ได้แก่ กลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) ซึ่งเป็นพวกที่ให้ผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น เช่น เอทานอล กรดอะซีติก กลีเซอรอล แมนนิทอล และคาร์บอนไดออกไซด์ จากการหมักน้ำตาลนอกเหนือจากกรดแลคติกแบคทีเรียแลคติกที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus brevis, Lb. fermentum, Lb. buchneri* รวมทั้ง *Leuconostoc* บางชนิด เช่น *L. cremoris, L. lactis, L. mesenteroides* เป็นต้น (ศิริโฉม, 2543)

แบคทีเรียแลคติกพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดินและพืชผัก และอาหารดิบ และมีความสำคัญในอาหาร โดยมีบทบาทในการผลิตอาหารหมัก (fermented foods) ชนิดต่าง ๆ เช่น ผักดอง นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ไส้กรอก แหนม และเนยแข็ง เป็นต้น การผลิตอาหารหมักบางชนิด เช่น ผักดอง และแหนม อาศัยกิจกรรมของแบคทีเรียแลคติกธรรมชาติหลายๆ ชนิดที่ติดมากับวัตถุดิบ ในขณะที่อาหารหมักบางชนิด เช่น นมเปรี้ยว และโยเกิร์ต ใช้หัวเชื้อแลคติกในรูปเชื้อบริสุทธิ์ (starter culture) ในการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ การตรวจสอบชนิด และจำนวนแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักมีความสำคัญเพื่อติดตามการดำเนินไปของกระบวนการหมัก เนื่อง จากแบคทีเรียแลคติกเป็นพวกที่ต้องการสารอาหารซับซ้อน ดังนั้นจึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไปได้ (ศิริโฉม, 2543) อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียแลคติกมักมีส่วนประกอบของวิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ ที่ใช้กันมาก ได้แก่ MRS broth หรือ MRS agar (de Man, Rogosa, Sharp agar) และ lactic agar เป็นต้น (Roberts, et al.,1995) การตรวจนับแบคทีเรียแลคติกอาจนับจำนวนแบคทีเรียกลุ่มนี้ทั้งหมดในตัวอย่าง หรือตรวจนับเฉพาะแบคทีเรียแลคติกบางกลุ่มก็ได้ เช่นนับเฉพาะพวกที่มีเซลล์รูปกลมเรียงต่อกันเป็นสาย (streptococci) หรือพวกเซลล์รูปท่อน (lactobacilli) หรือนับเฉพาะแบคทีเรียแลคติกบางชนิด เช่น *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ในโยเกิร์ต

12.6 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

-

12.7 ความปลอดภัย (Safety)

12.7.1 ต้องสวมเสื้อคลุมตลอดระยะเวลาปฏิบัติการเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ติดผิวหนังหรือเสื้อผ้า รวมทั้งป้องกันตัวเองและเสื้อผ้าจากการกระเด็นของสารเคมีและสิ่งสกปรกต่างๆ

12.7.2 ห้ามรับประทานอาหาร ดื่มหรือสูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนห้ามเคี้ยว หรือกัดดินสอ ปากกา

12.7.3 หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับหน้าหรือตาระหว่างปฏิบัติงาน

12.7.4 ก่อนและหลังปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อความสะอาดบริเวณปฏิบัติงานทุกครั้ง

12.7.5 ต้องติดฉลาก แสดง ชื่อ วันที่ ตัวอย่าง ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อหรืออื่นๆ ลงบน จานเพาะเชื้อหรืออุปกรณ์ ทดลองเพื่อป้องกันการล้างหรือนำไปทิ้งโดยไม่ตั้งใจ

12.7.6 ใช้ตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์ด้วยความระมัดระวัง ห้ามวางตะเกียงดังกล่าวไว้ใกล้ภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์หรือสารไวไฟต่างๆ รวมทั้งระมัดระวังมือและเส้นผม หรือส่วนต่างๆ ของร่างกายจากการถูกไฟลวก ดับตะเกียงทุกครั้งเมื่อเลิกใช้งาน

12.7.7 วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม จานเพาะเชื้อหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปล้าง

12.7.8 สไลด์ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปกำจัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

12.7.9 ก่อนและหลังปฏิบัติการทุกครั้งต้องล้างมือด้วยสบู่ และเช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์) ทุกครั้ง

12.8 เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and supplies)

12.8.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

12.8.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

12.8.3 กระดาษวัด pH (pH paper)

12.8.4 เครื่องชั่ง (Balance)

12.8.5 เครื่องแก้ว ได้แก่ Petri dishes, Pipette, dilution bottle, glass rod spreader

12.8.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

12.8.7 กรรไกรปลอดเชื้อ

12.8.8 เครื่องตีป่นอาหาร (Stomacher)

12.8.9 ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (Stomacher bag)

12.9 สารมาตรฐาน

12.9.1 MRS agar (de Man, Rogosa, Sharp agar)

12.9.2 Lee's agar

12.10 วิธีดำเนินการ (Procedures)

12.10.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

12.10.1.1 MRS agar (de Man, Rogosa, Sharp agar)

ส่วนผสม

- Peptone	10.0	กรัม
- Meat extract	10.0	กรัม
- Yeast extract	5.0	กรัม
- Glucose	20.0	กรัม
- Tween 80	1.0	กรัม
- Dipotassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
- Sodium acetate	5.0	กรัม
- Triammonium citrate	2.0	กรัม
- Manganese sulphate (hydrate)	0.05	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.2 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 6.2 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

12.10.1.2 Lee's agar

ส่วนผสม

- Tryptone	10.0	กรัม
- Yeast extract	10.0	กรัม
- Lactose	5.0	กรัม
- Sucrose	5.0	กรัม
- Calcium carbonate	3.0	กรัม
- Dipotassium phosphate	0.5	กรัม
- Bromcresol purple solution(0.2%)	10.0	มิลลิลิตร

- Agar 18.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 7.0 ± 0.2

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เติม calcium carbonate เขย่าให้เข้ากัน ก่อนเทใส่จานเพาะเชื้อเติม Bromcresol purple solution(0.2%) 10.0 มิลลิลิตร

12.10.1.3 3% Hygrogen peroxide solution

ส่วนผสม H_2O_2 3.0 มิลลิลิตร (คำนวณจากฉลากข้างขวด ความเข้มข้น 30 %)
น้ำกลั่น 100.0 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ตวง H_2O_2 มา 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 ด้วยน้ำกลั่น (ปรับปริมาตรด้วย Volumetric flask)

12.10.1.4 Peptone water 0.1%

ส่วนผสม

- Peptone 1.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1.0 ลิตร

pH 7.0 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายเปปโตน 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

12.10.2 วิธีการตรวจวิเคราะห์

<u>การนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด</u>

การนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งหมดในตัวอย่าง ทำได้โดยการเพาะตัวอย่างด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เช่น MRS agar และควรปรับสภาวะการบ่มเชื้อให้เหมาะสม คือ ไม่มีออกซิเจน และมีคาร์บอนไดออกไซด์ ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยการบ่มในโถเพาะเชื้อไร้ออกซิเจน (anaerobic jar) หรือในโถเพาะเชื้อที่เรียกว่า แคนเดิลจาร์ (candle jar) ก็ได้ หลังจากการบ่มเพาะเชื้อประมาณ 3 - 4 วัน แบคทีเรียแล็คติกจะเจริญเป็นโคโลนีขนาดเล็ก สีขาวหรือครีม ซึ่งควรนำโคโลนีเหล่านั้นมาย้อมสีแกรม เพื่อศึกษาดูรูปร่างและการเรียงตัวของเซล การติดสีแกรม รวมทั้งการทดสอบคะตะเลสด้วย ขั้นตอนการวิเคราะห์จำนวน แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด แสดงดังภาพ 12.1

ก. การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียแลกติก

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ
เทสารละลายเปปโตนปริมาตร 225 มิลลิลิตร
ลงในถุงนำไปตีด้วยเครื่องผสมอาหารเป็นเวลา 60 วินาที
↓
ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1},10^{-2},10^{-3}
ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร
↓
เทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่หลอมเหลว ลงในจานที่มีตัวอย่าง
จานละ 15 มิลลิลิตร หมุนจานเพื่อผสมให้เข้ากันทิ้งให้แข็งตัว
↓
บ่มจานอาหารในโถเพาะเชื้อไร้อากาศที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน
↓
เลือกโคโลนีที่มีขนาดเล็ก สีขาว หรือสีครีม นำไปย้อมแกรมและตรวจ
ดูเซลด้วยกล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งทดสอบคะตะเลส

ภาพ 12.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์จำนวนแลคติกแบคทีเรีย

การย้อมแกรม

ผลของแบคทีเรียแลคติกเซลรูปท่อนหรือรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์

การทดสอบคะตะเลส

- หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนโคโลนี
- สังเกตการเกิดฟองก๊าซ ผลการทดสอบไม่เกิดฟองก๊าซ (ผลลบ)

หมายเหตุ การนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อหาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีในจาน และคำนวณ CFU /g หรือ CFU /ml

การนับจำนวน *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus*

S. thermophilus และ *L. bulgaricus* เป็นหัวเชื้อแลกติกที่ใช้ผลิตโยเกิร์ต เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอในแต่ละครั้งของการหมักจะต้องควบคุมปริมาณหัวเชื้อทั้งสองชนิด ให้มีอัตราส่วนเท่าๆ กันตลอดเวลา ดังนั้นจึงควรตรวจสอบจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดในระหว่างกระบวนการผลิตโยเกิร์ตเป็นระยะๆ ซึ่งอาจทำได้โดยการนับเซลล์โดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่วิธีนี้ไม่สามารถแยกระหว่างเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตได้ จึงควรใช้วิธีนับโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งสองชนิดได้ ซึ่งได้แก่ Lee's agar อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้มีซูโครสเป็นส่วนผสมซึ่ง *L. bulgaricus* ใช้ไม่ได้ แต่ *S. thermophilus* ใช้ได้ นอกจากนั้นยังมีแลกโทส ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองใช้ได้ และมีบรอมครีซอลเพอร์เพิลเป็นอินดิเคเตอร์ของ pH ถ้าปรับความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งสองชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมจะทำให้เห็นความแตกต่างของโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละชนิดอันเนื่องมาจากการใช้น้ำตาลได้ กล่าวคือโคโลนีของ *L. bulgaricus* จะมีสีขาวในโคโลนีของ *S. thermophilus* จะมีสีเหลือง วิธีการนับจำนวน *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* แสดงดังภาพ 12.2

ข.การนับจำนวน *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus*

วิธีปฏิบัติ

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ
เทสารละลายเปบโตนปริมาตร 225 มิลลิลิตร
ลงในถุงนำไปตีด้วยเครื่องผสมอาหารเป็นเวลา 60 วินาที
↓
ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}
ลงในจานอาหาร LEE's agar จานละ 0.1 มิลลิลิตร
ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วผิวอาหาร
↓
บ่มเพาะเชื้อในโถเพาะเชื้อไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
↓
นับจำนวนโคโลนีสีเหลืองของ *S. thermophilus* และโคโลนีสีขาวของ *L. bulgaricus*
จากจานอาหาร
↓
หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีใน 1 จานของโคโลนีแต่ละชนิด และคำนวณ CFU/g

ภาพ 12.2 ขั้นตอนการตรวจนับจำนวน *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus*

บทปฏิบัติการที่ 13
การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหารกระป๋อง

13.1 ความมุ่งหมาย (Purpose)

เป็นคู่มือในการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหารกระป๋อง

13.2 การใช้งาน (Application)

เพื่อใช้เป็นวิธีปฏิบัติในการตรวจจุลินทรีย์ในอาหารกระป๋อง

13.3 เอกสารอ้างอิง (References)

13.3.1 ธีรพร กงบังเกิด. การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหารกระป๋อง. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร, 3 หน้า.

13.3.2 สิริพร ธนเสาวภาคย์. (2541). การตรวจสอบจุลินทรีย์ในอาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรด. เอกสารของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 4 หน้า.

13.3.3 สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2523). วิธีวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาเล่ม 1 อาหารกระป๋อง มอก. 335 เล่ม 1 -2523. กระทรวงอุตสาหกรรม. โรงพิมพ์คุรุสภา กรุงเทพฯ.

13.3.4 บุญส่ง แสงอ่อน. (2547). คู่มือจุลชีววิทยาทางอาหารภาคปฏิบัติการ. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยานเรศวร. 75 หน้า.

13.3.5 AOAC, (1995). Officical Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. 6th ed. Associations of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.

13.3.6 Downes, F. P. and lto, K. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

13.4 นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

-

13.5 หลักการทางวิทยาศาสตร์ (principle)

อาหารกระป๋อง

อาหารกระป๋อง หมายถึงอาหารที่ผ่านกรรรมวิธีแปรรูปด้วยความร้อนสูงเพื่อทำลายหรือยับยั้งการขยายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และบรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท (hermetically sealed) เนื่องจากกรรมวิธีในการแปรรูป นอกจากจะคำนึงถึงการถนอมอาหาร และความปลอดภัยในการบริโภคแล้ว คุณภาพของอาหารจะต้องมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด ฉะนั้นการกำหนดกระบวนการฆ่าเชื้อของอาหารกระป๋องจึงเป็นการทำให้อาหารอยู่ในสภาพปลอดเชื้อทางการค้า (commercial sterility)

การแปรรูปอาหารด้วยความร้อน มีปัจจัยที่มีอิทธิพลเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ที่สำคัญคือค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหาร เนื่องจากจะเป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ โดยทั่วไปอาหารกระป๋องแบ่งตามความเป็นกรดดังนี้

1. อาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำคือ อาหารกระป๋องที่มีค่า pH > 4.6 เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารทะเล นม และพืชบางชนิด เช่น ข้าวโพด ถั่ว และอื่นๆ อาหารกระป๋องประเภทนี้มักเน่าเสียโดยแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงจะทำให้อาหารเน่าเสียแบบไม่มีแก๊ส (กระป๋องไม่บวม) (Thermophilic flat-sour spoilage) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสียของอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ ได้แก่

- Aerobic sporeformers ที่สำคัญได้แก่ *Bacillus polymyxa*, *B. subtilis* และ *B. macerans* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ สร้างสปอร์ ทำให้อาหารมีกลิ่นเปรี้ยว ตกตะกอน ข้น หรือหนืด
- Anaerobic mesophiles เช่น *Clostridium botulinum* เจริญได้ดีในสภาพไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส อาหารจะมีกลิ่นเหม็นเน่า ยุ่ย และเละ กระป๋องอาจจะบวมถ้ามีการสร้างก๊าซมาก ถ้าพบ *C. botulinum* อาหารนั้นไม่ปลอดภัยในการบริโภค ดังนั้นอาหารกระป๋องชนิดที่มีความเป็นกรดต่ำ จึงกำหนดให้ใช้กระบวนการฆ่าเชื้อที่ทำลายสปอร์ของเชื้อ *Clostridium botulinum* ได้หมด
- Thermophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 43 องศาเซลเซียส สร้างสปอร์ได้ ทนความร้อนได้สูง การเสียของอาหารเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ แบ่งออกเป็น 3 ประเภทได้แก่

- Flat sour spoilage กระป๋องจะมีลักษณะปกติ ไม่บวม เนื่องจากเชื้อไม่สร้างก๊าซ pH ของอาหารจะลดต่ำลงกว่าเดิมทำให้อาหารมีรสเปรี้ยว จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุสำคัญของ Flat sour spoilage ได้แก่ *Bcillus stearothermophilus*

- Thermophilic anaerobe spoilage กระป๋องจะบวม ถ้ามีก๊าซมากอาจเกิดการระเบิดได้ อาหารมีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุ เช่น *Clostridium thermosaccharo lyticum* ทนความร้อนสูง สร้างสปอร์ เจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน

- Sulfide spoilage กระป๋องจะแบนปกติ อาหารมีสีคล้ำ หรือดำ มีกลิ่นก๊าซ H_2S แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุคือ *Clostridium nigrificans* ซึ่งสร้างสปอร์ เจริญได้ดีในสภาพไม่มีออกซิเจน

เจริญได้เฉพาะที่อุณหภูมิสูงเท่านั้น ก๊าซ H_2S ที่สร้างขึ้นจะละลายในอาหาร อาหารจะมีดำเนื่องจากปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างเหล็กกับ H_2S เกิดเป็นเหล็กซัลไฟด์ ซึ่งมีสีดำ

2. อาหารกระป๋องที่เป็นกรด (Acid canned food) คือ อาหารกระป๋องที่ค่า pH เท่ากับหรือต่ำกว่า 4.60 อาหารที่มีความเป็นกรด เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจะน้อย เช่นใช้ความร้อนเพียง 90 องศาเซลเซียส หรือต้มให้เดือดแล้วทำให้เย็นก็เพียงพอ อาหารประเภทนี้เช่น ผักและผลไม้ อาหารกระป๋องประเภทนี้มักเกิดการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ ซึ่งได้แก่

- Aciduric flat sour ได้แก่ *B. coagulans* เป็นแบคทีเรียรูปท่อน สร้างสปอร์ ทนสภาพความเป็นกรดได้ดี สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง 60 องศาเซลเซียส ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนเล็กน้อย
- Butyric anaerobe เช่น *Clostridium butyricum, C. pasteurianum* เป็นแบคทีเรียรูปท่อน สร้างสปอร์ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 - 35 องศาเซลเซียส ในสภาพไม่มีออกซิเจน สร้างกรดบิวทิริค ก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้กระป๋องบวม อาหารมีกลิ่นหมักเหม็นเปรี้ยว
- Yeast การเสียเนื่องจาก yeast กระป๋องจะบวม มีกลิ่นหมัก เนื่องจาก yeast จะสร้างแอลกอฮอล์ และผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
- Heat-resistant molds ส่วนใหญ่ได้แก่เชื้อ *Byssochlamys fulva, Neosartorya jischen* และ *Tararomyces flavas* ราเหล่านี้สร้าง ascospores ที่ทนความร้อนได้สูง มักพบปนเปื้อนอยู่ในผลไม้ และน้ำผลไม้เข้มข้นก่อนที่จะทำการฆ่าเชื้อ ลักษณะกระป๋องไม่บวม อาหารจะมีกลิ่นอับของรา และอาจพบเส้นใยของรา

13.6 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

ตาราง การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสินใจ

13.7 ความปลอดภัย (Safety)

13.7.1 ต้องสวมเสื้อคลุมตลอดระยะเวลาปฏิบัติการเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ติดผิวหนังหรือเสื้อผ้า รวมทั้งป้องกันตัวเองและเสื้อผ้าจากการกระเด็นของสารเคมีและสิ่งสกปรกต่างๆ

13.7.2 ห้ามรับประทานอาหาร ดื่มหรือสูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนห้ามเคี้ยว หรือกัดดินสอ ปากกา

13.7.3 หลีกเหลี่ยงการสัมผัสกับหน้าหรือตาระหว่างปฏิบัติงาน

13.7.4 ก่อนและหลังปฏิบัติงานทุกครั้งต้องทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อความสะอาดบริเวณปฏิบัติงานทุกครั้ง

13.7.5 ต้องติดฉลาก แสดง ชื่อ วันที่ ตัวอย่าง ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อหรืออื่นๆ ลงบน จาน เพาะเชื้อหรืออุปกรณ์ ทดลองเพื่อป้องกันการล้างหรือนำไปทิ้งโดยไม่ตั้งใจ

13.7.6 ใช้ตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์ด้วยความระมัดระวัง ห้ามวางตะเกียงดังกล่าวไว้ใกล้ภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์หรือสารไวไฟต่างๆ รวมทั้งระมัดระวังมือและเส้นผม หรือส่วนต่างๆ ของร่างกายจากการถูกไฟลวก ดับตะเกียงทุกครั้งเมื่อเลิกใช้งาน

13.7.7 วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม จานเพาะเชื้อหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปล้าง

13.7.8 สไลด์ที่ปนเปื้อนเชื้อต้องนำไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปกำจัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

13.7.9 ก่อนและหลังปฏิบัติการทุกครั้งต้องล้างมือด้วยสบู่ และเช็ดด้วยโต๊ะปฏิบัติการด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์) ทุกครั้ง

13.7.10 ข้อควรระวัง ห้ามทดลองชิมตัวอย่างอาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ pH>4.6 ที่ผ่านการบ่มเชื้อโดยเด็ดขาด เพราะอาจมีเชื้อ *Clostridium botulinum* เจริญและจะก่อให้เกิดอาหารอาหารเป็นพิษถึงตายได้ (เป็นพิษที่รุนแรงที่สุด)

13.8 เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and supplies)

13.8.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ควบคุมอุณหภูมิ 35 และ 55 องศาเซลเซียส

13.8.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

13.8.3 เครื่องวัด pH (pH meter)

13.8.4 เครื่องชั่ง (Balance)

13.8.5 เครื่องแก้ว ได้แก่ Petridish, Pipette, Dilution bottle, Glass rod Spreader, Slide

13.8.6 อุปกรณ์เปิดฝากระป๋อง

13.8.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

13.8.8 กรรไกรปลอดเชื้อ

13.8.9 เครื่องตีป่น (Stomacher)

13.8.10 ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (Stomacher bag)

13.8.11 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

13.8.12 น้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับเช็ดโต๊ะปฏิบัติการ

13.9 สารมาตรฐาน (Standard)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

13.9.1 Butterfield's phosphate – buffered dilution water

13.9.2 Dextrose Tryptone Bromcresol Purple Broth

13.9.3 Cook Meat Medium

13.9.4 Iron Sulfite Agar

13.9.5 Malt Agar

13.9.6 Plate Count Agar

13.9.7 Potato Dextrose Agar

13.10.วิธีดำเนินการ (Procedures)

13.10.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

13.10.1.1 Butterfield's phosphate – buffered dilution water

ก. Stock Solution

- KH_2PO_4	34	กรัม
- น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

<u>วิธีการเตรียม</u>

ละลาย Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 34 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย 1 N NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส หรือที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บไว้ในตู้เย็น

ข. Dilution Blanks

นำ Stock Solution มา 1.25 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองบรรจุ 9 มิลลิลิตร บรรจุขวดแก้วทนร้อน 90 มิลลิลิตร และ 225 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

13.10.1.2 Dextrose Tryptone Bromcrersol Purple Broth

<u>ส่วนผสม</u>

- Dextrose	10.0	กรัม
- Beef extract	5.0	กรัม
- Peptone	5.0	กรัม
- Bromeresol purple (1.6% in ethanol)	2.0	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0 ± 0.2

<u>วิธีการเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร บรรจุใส่หลอดแก้วขนาด 15 x 150 มิลลิลิตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

13.10.1.3. Cook Meat Medium

ส่วนผสมพื้นฐาน

- Beef Heart(from 454)	98.0	กรัม
- Peptone	1.0	กรัม
- Dextrose	2.0	กรัม
- Sodium chloride	5.0	กรัม
- Distilled water	1.0	ลิตร

pH 7.0 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำบรรจุใส่หลอดแก้วขนาด 15 x 150 มิลลิลิตร หลอดละ 15 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

13.10.1.4 Iron Sulfite Agar

ส่วนผสม

- Peptone from casein	15.0	กรัม
- Yeast extract	10.0	กรัม
- Sodium sulfite	5.0	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 6.9 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.9 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ก่อนใช้ ให้เติม Iron(II) sulfate 7% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 1 ลิตร

13.10.1.5 Malt agar

ส่วนผสม

- Malt extract	30.0	กรัม
- Peptone from soymeal	3.0	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 5.6 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 5.6 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ต้มประมาณ 10 นาที ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ เทใส่จานเพาะเชื้อ 15 มิลลิลิตร

13.10.1.6 Plate Count Agar

ส่วนผสม

- Tryptone	5.0	กรัม
- Yeast extract	2.5	กรัม
- D-glucose	1.0	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.0 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด บรรจุใส่ภาชนะตามขนาดที่ต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีหรือ ชั่ง PCA 22.5 กรัม (Merck) /น้ำกลั่น 1 ลิตร ละลายและบรรจุใส่ภาชนะและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกัน

13.10.1.7 Potato Dextrose Agar

ส่วนผสม

- Potato infusion (infusion from 200 g potatoes)	4.0	กรัม
- D-glucose	20.0	กรัม
- Agar	15.0	กรัม
- น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 5.6 ± 0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลายปรับ pH เป็น 5.6 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

13.10.2 วิธีการตรวจสอบในอาหารกระป๋อง

1. ขั้นตอนการตรวจสอบจุลินทรีย์ในอาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ

1.1 การชักตัวอย่าง ทำการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋องที่ผลิตขึ้นในรุ่น (Lot) เดียวกัน โดยปฏิบัติตามตารางการชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสินของสำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม (ตารางที่ 13.1)

1.2 ทำการ Incubation test ทำการตรวจลักษณะภายนอกของกระป๋อง ก่อนที่จะลอกฉลากออกให้บันทึกรายละเอียดบนฉลากได้แก่ ชื่ออาหาร วันเดือนปีที่ผลิต ลักษณะตัวอย่าง ลักษณะภาชนะบรรจุเป็นต้น ไว้ก่อน พร้อมทั้งทำเครื่องหมายไว้บนกระป๋อง เช่น การเป็นสนิม การบุบ การบวม กระป๋องที่บวมไม่ต้องทำ Incubation test แบ่งตัวอย่างเป็นสามส่วน นำส่วนหนึ่งไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน อีกส่วนเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน และอีกส่วนบ่มในตู้อบเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 7 - 10 วัน ถ้ากระป๋องบวมระหว่างการบ่มเชื้อไม่ต้องนำมาวิเคราะห์

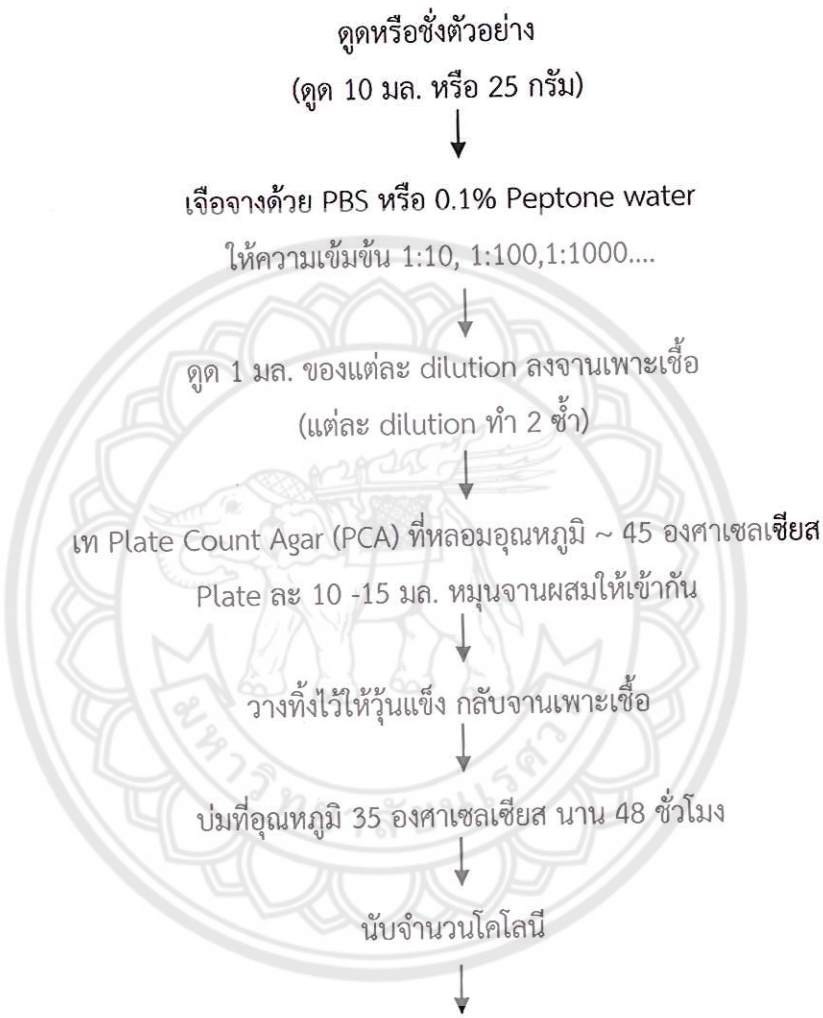
1.3 การเตรียมตัวอย่างกระป๋อง เมื่อครบกำหนดเวลาในการบ่มให้เตรียมการตรวจสอบดังนี้

การเปิดกระป๋องด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ วิธีการ

- ดึงฉลากออก : ตรวจความบกพร่องของกระป๋อง บันทึกผล จากนั้นทำความสะอาดกระป๋อง ถ้ามีสิ่งสกปรก หรือน้ำมันติออยู่ อาจต้องล้างด้วยผงซักฟอก ล้างน้ำเช็ดให้แห้งด้วยกระดาษทำความสะอาด
- กรณีกระป๋อง : ให้ล้างกระป๋องให้สะอาด เช็ดให้แห้ง เช็ดฝากระป๋องด้านหนึ่งด้วย เอทานอล 95% เผาด้วยเปลวไฟเพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็น เปิดฝากระป๋องด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
- กรณีภาชนะแก้ว : ให้ทำความสะอาดฝาเปิดลนฝาเปิดด้วยเปลวไฟเล็กน้อย จากนั้นเปิดฝาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (อุปกรณ์ที่ใช้เปิดฝาต้องลน ด้วยเปลวไฟเช่นกัน)
- กรณีภาชนะที่ไม่แข็ง (ถุง) : ทำความสะอาดผิวภายนอกของภาชนะบรรจุ ด้วยผงซักฟอกที่ทำลายเชื้อได้ ทำให้แห้งด้วยผ้าทำความสะอาดที่ไร้เชื้อจากนั้นเผากรรไกรด้วยเปลวไฟ ตัดปลายด้านบนของภาชนะใต้แนวที่ปิดผนึกให้เปิดกว้างประมาณ 2-3 นิ้ว (อาจตัดที่มุมถุง) จากนั้นนำไปเพาะเชื้อทันที

1.4 วิธีการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ

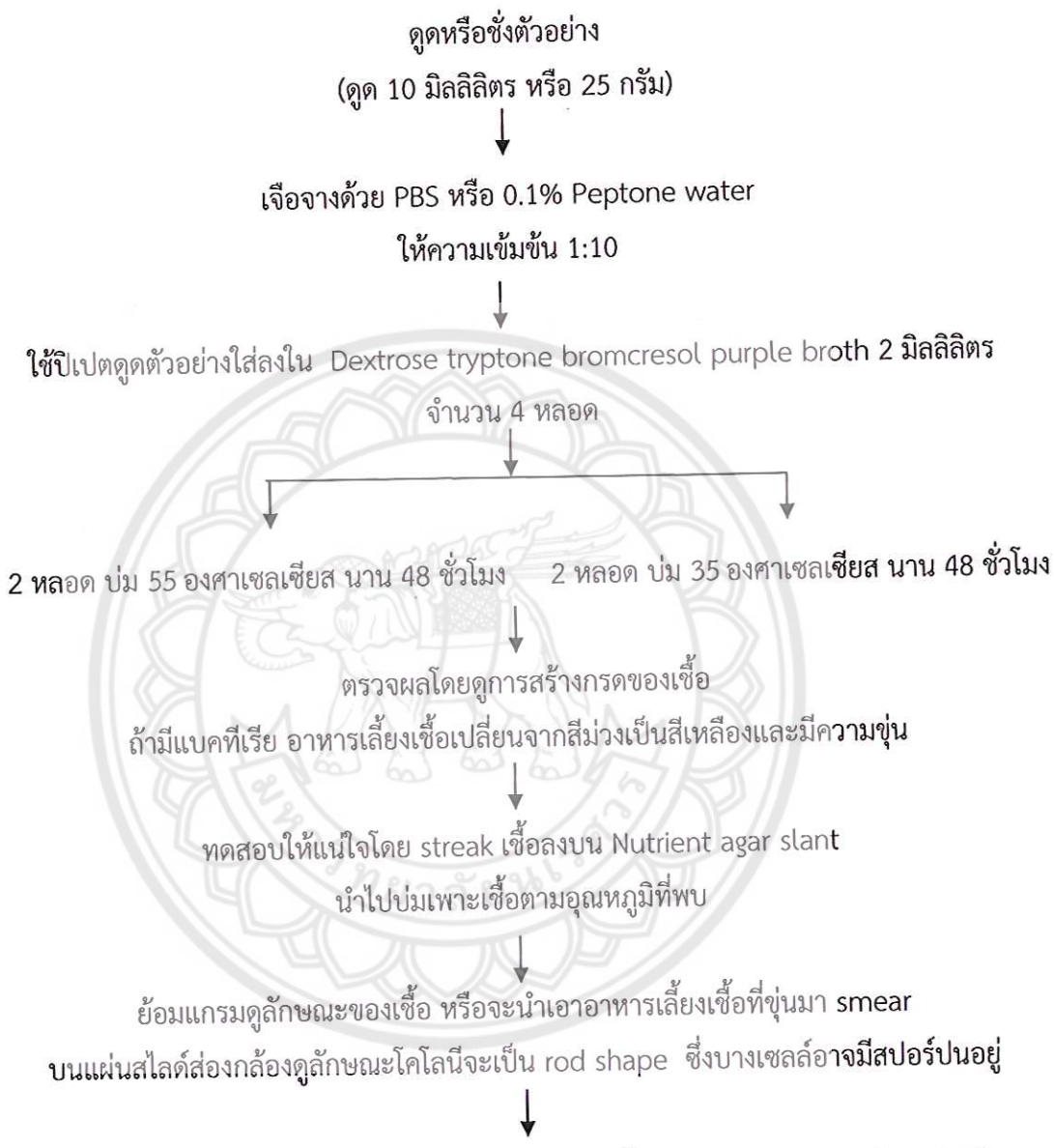
1.4.1 วิธีวิเคราะห์ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) ในอาหารกระป๋องชนิดกรดต่ำ ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ แสดงดังภาพ 13.1



ภาพ 13.1 ขั้นตอนวิธีวิเคราะห์ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) ในอาหารกระป๋องชนิดกรดต่ำ

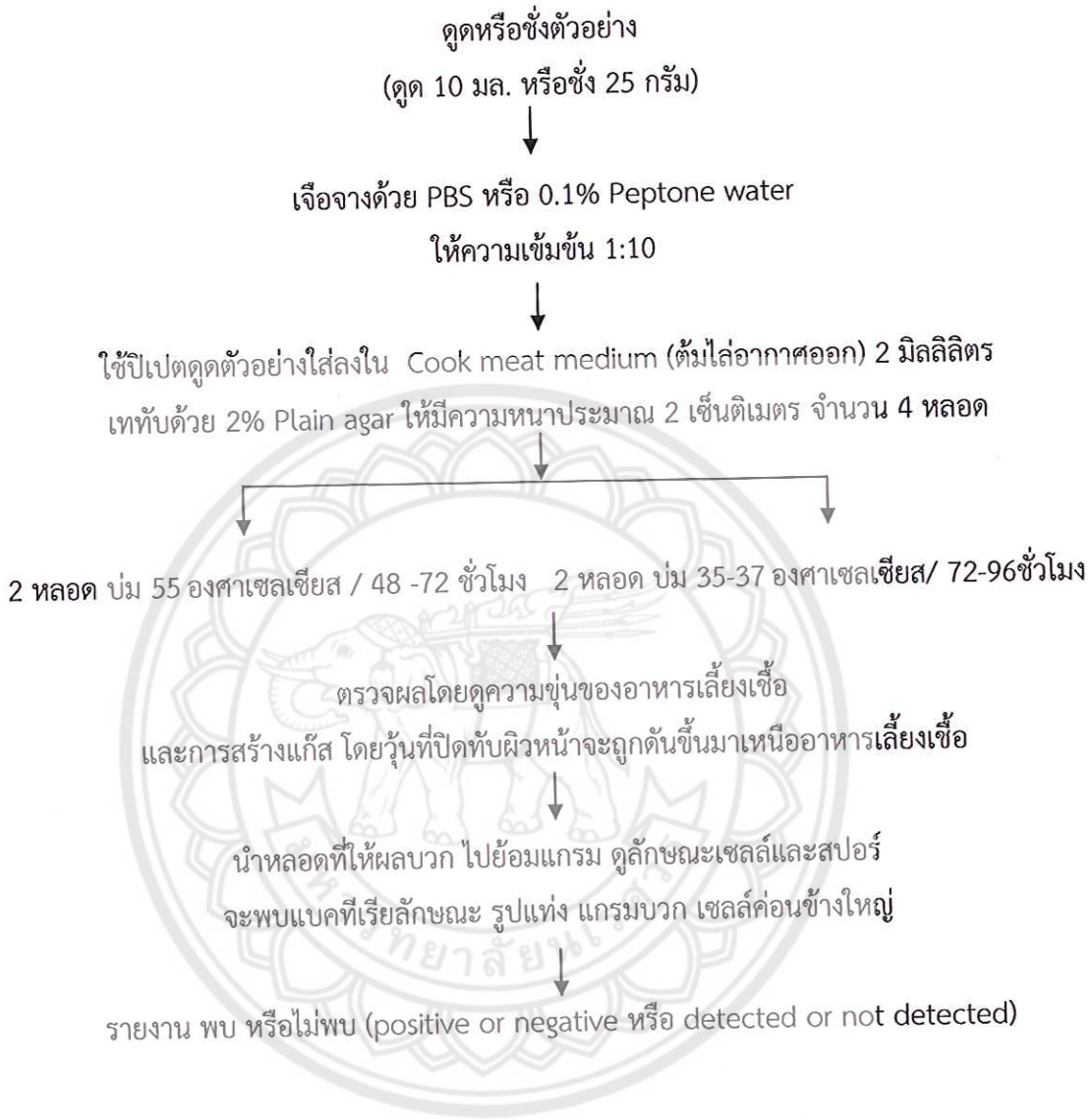
1.4.2 การวิเคราะห์ Flat Sour ชนิด Thermophilic และ Mesophilic ในอาหารกระป๋องชนิดกรดต่ำ

ขั้นตอนการวิเคราะห์ แสดงดังภาพ 13.2



ภาพ 13.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ Flat Sour ชนิด Thermophilic และ Mesophilic ในอาหารกระป๋องชนิดกรดต่ำ

1.4.3 การวิเคราะห์ Flat Sour ชนิด Mesophilic (Putrefactive) anaerobes ในอาหารกระป๋องชนิดกรดต่ำ วิธีวิเคราะห์แสดงดังภาพ 13.3



ภาพ 13.3 การวิเคราะห์ Flat Sour ชนิด Mesophilic (Putrefactive) anaerobes ในอาหารกระป๋องชนิดกรดต่ำ

1.4.4 การวิเคราะห์ Sulfide spoilage ในอาหารกระป๋องชนิดกรดต่ำ วิธีวิเคราะห์แสดงดังภาพ 13.4

ดูดหรือชั่งตัวอย่าง
(ดูด 10 มิลลิตร หรือชั่ง 25 กรัม)
↓
เจือจางด้วย PBS หรือ 0.1% Peptone water
ให้ความเข้มข้น 1:10
↓
ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างใส่ลงใน หลอดทดสอบเปล่าที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 2 มิลลิลิตร
เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Iron Sulfite Agar ให้มีความหนาประมาณ 5-6 เซนติเมตร จำนวน 2 หลอด
↓
บ่ม 55 องศาเซลเซียส นาน 24 - 48 ชั่วโมง
↓
ตรวจผลโดยดูการเกิดโคโลนีสีดำ
โคโลนีสีดำเนื่องจากการสร้างแก๊ส H_2S ของเชื้อที่ทำปฏิกิริยากับ Ferric citrate
ของอาหาร Iron Sulfite Agar ซึ่งมีสีดำ
↓
รายงาน พบ หรือไม่พบ (positive or negative หรือ detected or not detected)

ภาพ 13.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ Sulfide spoilage ในอาหารกระป๋องชนิดกรดต่ำ

2. การตรวจสอบจุลินทรีย์ในอาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรด มีขั้นตอนดังนี้

2.1 การชักตัวอย่าง ทำการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋องที่ผลิตขึ้นในรุ่น (Lot) เดียวกัน โดยปฏิบัติตามตารางการชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสินของสำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม (ตารางที่ 13.1)

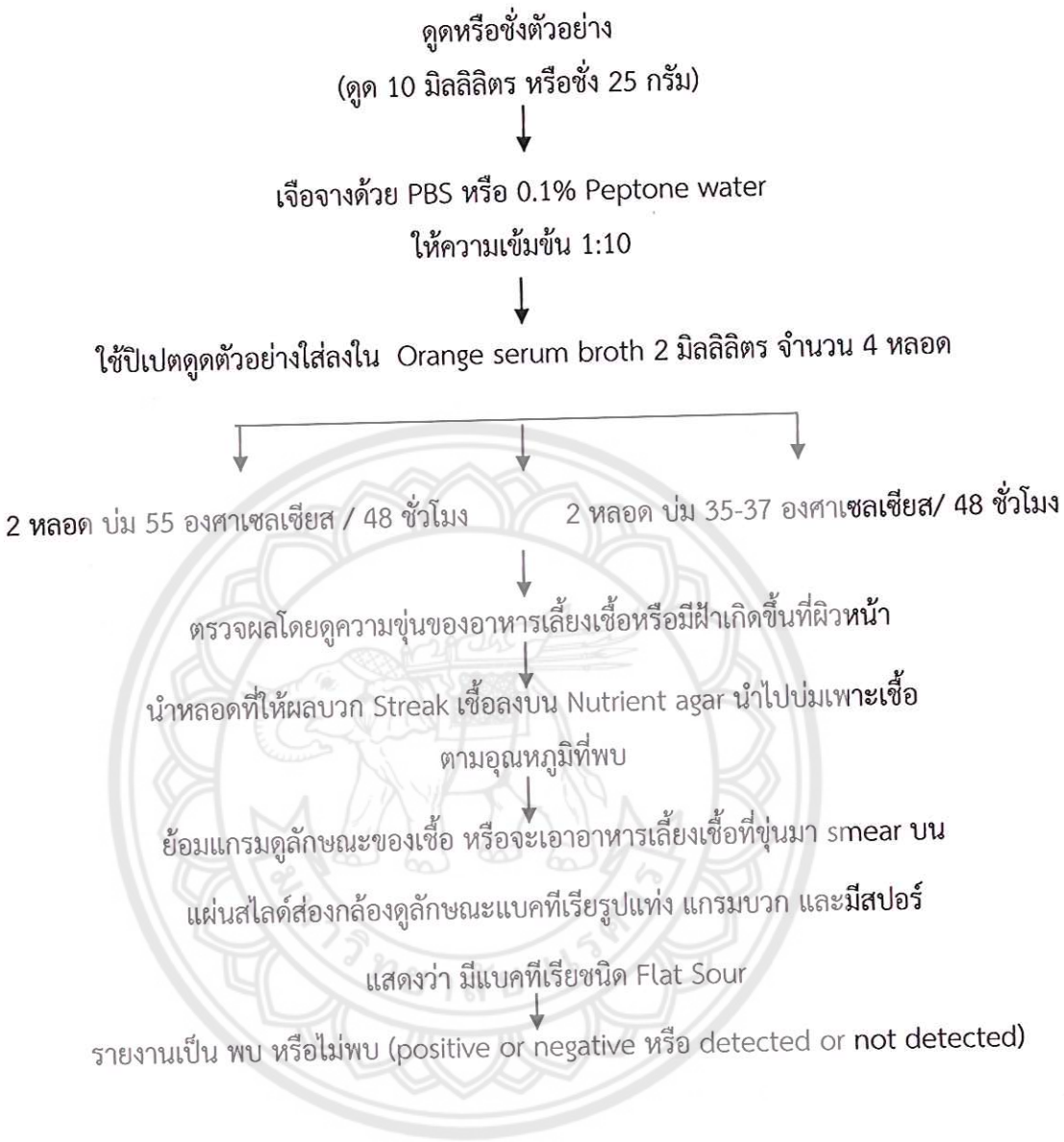
2.2 ทำการ Incubation test ทำการตรวจลักษณะภายนอกของกระป๋อง ก่อนที่จะลอกฉลากออกให้บันทึกรายละเอียดบนฉลากได้แก่ ชื่ออาหาร วันเดือนปีที่ผลิต ลักษณะตัวอย่าง ลักษณะภาชนะบรรจุเป็นต้น ไว้ก่อน พร้อมทั้งทำเครื่องหมายไว้บนกระป๋อง เช่น การเป็นสนิม การบุบ การบวม กระป๋องที่บวมไม่ต้องทำ Incubation test แบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน นำส่วนหนึ่งไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 35 -37 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน อีกส่วนเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน ถ้ากระป๋องบวมระหว่างการบ่มเชื้อไม่ต้องนำมาวิเคราะห์

2.3 การเตรียมตัวอย่างกระป๋อง ปฏิบัติเช่นเดียวกับการวิเคราะห์อาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ

2.4 วิธีวิเคราะห์

2.4.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) ใช้วิธีวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์อาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ

2.4.2 การวิเคราะห์ Flat Sour ชนิด Thermophilic และ Mesophilic ในอาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรด ขั้นตอนการวิเคราะห์แสดงดังภาพ 13.5



ภาพ 13.5 ขั้นตอนวิเคราะห์ Flat Sour ชนิด Thermophilic และ Mesophilic ในอาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรด

2.4.3 ยีสต์และรา (Yeast and Mold) วิเคราะห์เช่นเดียวกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารชนิดกรดต่ำ แต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Agar หรือ Potato Dextrose Agar ที่ปรับ pH เป็น 3.5 แล้ว และบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน นับจำนวนโคโลนีของยีสต์และรา คำนวณเป็นโคโลนีต่อกรัมหรือมิลลิลิตร

ตาราง 13.1 การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

ขนาดรุ่นกระป๋อง			ระดับการตรวจสอบ			
			ระดับที่ 1		ระดับที่ 2	
			ขนาดตัวอย่าง	เลขจำนวนที่ยอมรับ	ขนาดตัวอย่าง	เลขจำนวนที่ยอมรับ
1. อาหารกระป๋องที่มีน้ำหนักสุทธิน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 กิโลกรัม						
	ไม่เกิน	4,800	6	1	13	2
4,801	ถึง	24,000	13	2	21	3
24.001	ถึง	48,000	21	3	29	4
48,001	ถึง	84,000	29	4	48	6
84,001	ถึง	144,000	48	6	84	9
144,001	ถึง	240,000	84	9	126	13
240,000	ขึ้นไป		126	13	200	19
2. อาหารกระป๋องที่มีน้ำหนักสุทธิเกิน 1 กิโลกรัม แต่ไม่เกิน 4.5 กิโลกรัม						
	ไม่เกิน	2,400	6	1	13	2
2,401	ถึง	15,000	13	2	21	3
15,001	ถึง	24,000	21	3	29	4
24,001	ถึง	42,000	29	4	48	6
42,001	ถึง	72,000	48	6	84	9
72,001	ถึง	120,000	84	9	126	13
120,001	ขึ้นไป		126	13	200	19
3. อาหารกระป๋องที่มีน้ำหนักสุทธิเกิน 4.5 กิโลกรัม						
	ไม่เกิน	600	6	1	13	2
601	ถึง	2,000	13	2	21	3
2,001	ถึง	7,200	21	3	29	4
72,001	ถึง	15,000	29	4	48	6
15,001	ถึง	24,000	48	6	84	9
24,001	ถึง	42,000	84	9	126	13
42,001	ขึ้นไป		126	13	200	19

บรรณานุกรม

จารุวรรณ ศิริพรรณพร. (ผู้บรรยาย). (16-17 กุมภาพันธ์ 2541). เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพ ทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร" สำหรับบุคลากรบริษัทวันไทยอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด . หน้า 1-11. กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญศรี จงเสรีจิตต์. (2542). คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาของอาหาร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

บุญส่ง แสงอ่อน. (2547). คู่มือจุลชีววิทยาทางอาหารภาคปฏิบัติการ. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยานเรศวร. 75 หน้า.

มาลัย บุญรัตนกรกิจ. (ผู้บรรยาย). (16 - 17 กุมภาพันธ์ 2541). เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร" สำหรับบุคลากรบริษัทวันไทยอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด. หน้า 37- 54. กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เรณู ปิ่นทอง. (2537). คู่มือจุลชีววิทยาทางอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 242 หน้า

วลัยรัตน์ จันทรปานนท์ และเพ็ญขวัญ ชมปรีดา. (2545). คู่มือปฏิบัติการ การวัดค่าปัจจัยคุณภาพทางชีวภาพ. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 44 หน้า.

สร้อยทอง สายหยุดทอง. (ผู้บรรยาย). (16-17 กุมภาพันธ์ 2541). เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "เทคนิคปฏิบัติการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร" สำหรับบุคลากรบริษัทวันไทยอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด. หน้า 51 - 62. กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2523). วิธีวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา เล่ม 1 อาหารกระป๋อง มอก. 335 เล่ม 1 -2523. กระทรวงอุตสาหกรรม. โรงพิมพ์คุรุสภา กรุงเทพฯ.

AOAC. (1995). Official Methods of Analyses of Association of Official Analytical Chemists.16th ed. Associations of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.

Difco Laboratories. (2009). Difco & BBL Manual of Microbiological Culture Media and Reagents . 2nd ed., Sparks, Maryland 211152 USA.

Downes, F.P. and K. It O. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological

Examination of Foods, 4th ed. American Public Health Association. Washington D.C. 676 p.

Granum, P.E. (1994). *Bacillus cereus* and its toxins. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 76: 61S-66S.

ICMSF. (1998). Microorganisms in Foods. Blackie Academic and Profession, London.

Merck company. (2002). Merck Microbiological Manual. KGaA, Darmstadt, Germany. From : www. http://service.merck.de/microbiology/

Rhodehamel, E.J. and Harmon, S.M. (2001). *Clostridium perfringens*. Bacteriological Analytical Manual (BAM) [online]. Available: http://www. fda.gov/Food/ Science Research/Laboratory Methods /Bacteriological Analytical Manual BAM/ ucm070878. htm [2009, May 29].

Roberts, D., Hooper, W. and Greenwood, W. (1995). Practical food microbiology (Methods for the examination of food for micro-organism of public health significance), 2nd ed. Public health laboratory service. London. 232 p.

Sacks, L.E. and Thompson, P.A. (1978). "Clear, Defined Medium for the Sporulation of *Clostridium perfringens*." Journal Applied and environmental microbiology. Vol.35. pp. 405-410.

Shinagawa, K. (1993). Serology and characterization of *Bacillus cereus* in relation to Toxin production. Bull. Int. Dairy Fed. 287: 42-49.

Tallent, S.M., Kotewicz, K.M. and Bennett, R.W. (2002). *Bacillus cereus*. Bacteriological Analytical Manual (BAM) [online]. Vailable :http://www.fda. gov/Food/ Science Research/ Laboratory Methods/Bacteriological Analytical Manual BAM/ ucm064948.htm [2009, May 29].

Weagant, S.D., Feng P. and Stanfield J.T. (2001) Chapter 8: *Yersinia entercolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In Bacteriological Analytical Manual Online. Vailable : http://www. fda. gov/Food/

Zimbro M.J. and Power D.A. (2003). Difco & BBL Manual of Microbiological Culture Media. Maryland USA.

U.S. Food and Drug Administration. (1995). Bacteriological Analytical Manual.8th ed. AOAC International. Gaitheraburg, MD.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวก 1. MPN สำหรับ 3 หลอด ความเข้มข้น 0.1, 0.01, และ 0.001 MPN/กรัม ที่ระดับนัยสำคัญ 95%

Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

ตารางภาคผนวก 1. MPN สำหรับ 5 หลอด ความเข้มข้น 0.1, 0.01, และ 0.001 MPN/กรัม ที่ระดับนัยสำคัญ 95%

Pos. Tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf.lim.	
0.1	0.01	0.001		Low	High	0.1	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<1.8	-	6.8	4	0	2	21	6.8	40
0	0	1	1.8	0.09	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	1	0	1.8	0.09	6.9	4	1	0	17	6	40
0	1	1	3.6	0.7	10	4	1	1	21	6.8	42
0	2	0	3.7	0.7	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	1	3	31	10	70
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
1	0	0	2	0.1	10	4	2	1	26	9.8	70
1	0	1	4	0.7	10	4	2	2	32	10	70
1	0	2	6	1.8	15	4	2	3	38	14	100
1	1	0	4	0.7	12	4	3	0	27	9.9	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	1	33	10	70
1	1	2	8.1	3.4	22	4	3	2	39	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	0	34	14	100
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	1	40	14	100
1	3	0	8.3	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	1	10	3.5	22	4	5	0	41	14	100
1	4	0	11	3.5	22	4	5	1	48	15	120
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	0	23	6.8	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	1	31	10	70
2	0	2	9.1	3.4	22	5	0	2	43	14	100
2	1	0	6.8	1.8	17	5	0	3	58	22	150
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	0	33	10	100
2	1	2	12	4.1	26	5	1	1	46	14	120
2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	2	63	22	150
2	2	1	12	4.1	26	5	1	3	84	34	220

ตารางภาคผนวก 2 (ต่อ)

2	2	2	14	5.9	36	5	2	0	49	15	150
2	3	0	12	4.1	26	5	2	1	70	22	170
2	3	1	14	5.9	36	5	2	2	94	34	230
2	4	0	15	5.9	36	5	2	3	120	36	250
3	0	0	7.8	2.1	22	5	2	4	150	58	400
3	0	1	11	3.5	23	5	3	0	79	22	220
3	0	2	13	5.6	35	5	3	1	110	34	250
3	1	0	11	3.5	26	5	3	2	140	52	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	3	180	70	400
3	1	2	17	6	36	5	3	4	210	70	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	0	130	36	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	1	170	58	400
3	2	2	20	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	3	0	17	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	2	24	9.8	70	5	4	5	430	150	1,100
3	4	0	21	6.8	40	5	5	0	240	70	710
3	4	1	24	9.8	70	5	5	1	350	100	1100
3	5	0	25	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
4	0	0	13	4.1	35	5	5	3	920	220	2600
4	0	1	17	5.9	36	5	5	4	1600	400	4600
						5	5	5	>1600	700	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวเพชชรุ้ง เสนานุช

วันเดือนปีเกิด 22 กันยายน 2516

สถานที่เกิด อำเภอชาติตระการ จังหวัดพิษณุโลก

ที่อยู่ปัจจุบัน 68 ม. 2 ตำบลป่าแดง อำเภอชาติตระการ จังหวัดพิษณุโลก
โทร.081-727-72579 E-mail: Petrungs@nu.ac.th

สถานที่ทำงาน ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
99 ม.9 ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2553 วุฒิ วท.ม. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร จากคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
- พ.ศ. 2539 วุฒิ วท.บ. เทคโนโลยีการเกษตร จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
- พ.ศ. 2535 วุฒิมัธยมศึกษาปีที่ 6 (สายวิทยาศาสตร์) จากโรงเรียนชาติตระการวิทยา จังหวัดพิษณุโลก

ประวัติการทำงาน

- 16 เมษายน 2539 – ปัจจุบัน
  ปฏิบัติงานตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์